

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

SYNTHÈSE D'ANDROGÈNES DIMÉRIQUES POSSÉDANT UN AXE DE  
SYMÉTRIE C<sub>2</sub> POUR UNE ACTION HORMONOTHÉRAPEUTIQUE  
VIS-À-VIS LE CANCER DE LA PROSTATE

MÉMOIRE PRÉSENTÉ  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE EXTENSIONNÉE DE  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

PAR  
ALEXIS PAQUIN

MAI 2022

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire, de cette thèse ou de cet essai a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire, de sa thèse ou de son essai.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire, cette thèse ou cet essai. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire, de cette thèse et de son essai requiert son autorisation.

*There is no better way to understand  
something than actually building it yourself.*

K. C. Nicolaou

## REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier chaudement mon directeur de recherche, le professeur Gervais Bérubé, pour son encadrement et pour m'avoir octroyé le privilège de travailler dans son laboratoire. Gervais, de ton enseignement et de ta personne, je retiens ton esprit minutieux, ton souci du détail, ta rigueur scientifique, ta passion pour la découverte et ta bonté sans bornes. J'ai appris sous ta direction les qualités qui me semblent essentielles au cheminement d'un bon scientifique, et je compte appliquer ces enseignements tout au long de mon parcours académique et professionnel. Je remercie également mon collègue de laboratoire, Francis, pour tous les bons moments passés ensemble. Ton esprit pragmatique et ta gentillesse m'ont grandement marqué, je m'estime chanceux d'avoir pu te côtoyer. Merci aussi aux nombreux stagiaires avec qui j'ai eu le plaisir de travailler durant mes études. Votre travail et votre présence au laboratoire ont certainement contribué au succès de mon projet de maîtrise.

Je tiens également à témoigner toute ma gratitude à mon codirecteur, le professeur Carlos Reyes-Moreno, pour son apport à la recherche que j'ai réalisée lors des deux dernières années. Merci à Yassine et Laurie pour les nombreuses heures passées à tester les propriétés biologiques des molécules que j'ai synthétisées. Merci également au Dr Irina F. Sevrioukova pour les belles collaborations.

Je tiens à adresser mes remerciements au professeur Benoît Daoust pour la qualité de l'enseignement qu'il m'a prodigué au cours de mes études graduées. Merci aussi à mes collègues du laboratoire Daoust: Clodie, Gabrielle,



Guillaume et Jonathan, pour l'excellente compagnie et les nombreux fous rires. Vos amitiés me sont précieuses. Un merci tout particulier au Dr Simon Ricard pour ses excellents conseils et sa grande générosité. Je suis aujourd'hui convaincu que mes études ne se seraient pas aussi bien déroulées sans ton aide et ton support.

Merci aux techniciens du département de Chimie, biochimie et physique: Francis, Jean-Philippe, Jocelyn et Vicky. Votre grande disponibilité, votre expertise et votre volonté d'aider les étudiants gradués sont remarquées et grandement appréciées. Je crois que l'on peut dire que les travaux de la majorité des étudiants de 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> cycle du département seraient grandement délayés si ce n'était de votre travail. Merci aussi au personnel administratif et au personnel de soutien qui se sont toujours montrés chaleureux à mon endroit et qui ont su faciliter mon parcours académique.

Bien entendu, je remercie mon père Jean-Pierre, ma mère Marie-Claude et mon frère Nicolas pour leurs encouragements et leurs supports durant toute la durée de ma scolarité. Je ne me serais jamais rendu où je suis sans vous.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à ma conjointe, Maude, pour avoir cru en moi et avoir été à mes côtés tout au long de mes études collégiales et universitaires. Merci, Maude de m'avoir soutenu et aimé pendant toutes ces années. Rien n'aurait été pareil sans toi.

Enfin, je tiens à remercier mes amis et mes proches qui ont tous su contribuer, à leurs façons, à mon cheminement des dernières années. Je partage ce mémoire avec vous.

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES SCHÉMAS .....	xi
LISTE DES SPECTRES.....	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES .....	xv
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS.....	xviii
RÉSUMÉ .....	xix
INTRODUCTION .....	1
CHAPITRE I ASPECTS BIOLOGIQUES ET MOLÉCULAIRES DU CANCER DE LA PROSTATE.....	3
1.1 Anatomie et physiologie de la prostate.....	3
1.1.1 Structures histologiques .....	5
1.2 Cancer de la prostate.....	6
1.2.1 Types de cancer.....	7
1.2.2 Classification et gradation .....	8
1.3 Causes, développement et croissance cellulaire du cancer.....	12
1.3.1 Principales anomalies génétiques associées au cancer de la prostate .....	12
1.3.2 Épidémiologie.....	14
1.3.3 Androgènes et hormonodépendance .....	15
1.4 Thérapies et traitements contre le cancer de la prostate .....	19
CHAPITRE II PROPRIÉTÉS ANTIANDROGÉNIQUES DES DIMÈRES STÉROÏDIENS .....	25
2.1 Généralités sur les dimères .....	25
2.2 Éléments de symétrie.....	26
2.2.1 Symétrie moléculaire dans la nature .....	30

2.3 Antiandrogènes dimériques.....	32
2.3.1 Avantages et inconvénients de la thérapie à base de ligands dimériques ..	35
CHAPITRE III DESCRIPTION ET FONDEMENTS DU PROJET DE RECHERCHE	
.....	37
3.1 Travaux antérieurs .....	38
3.2 Objectifs du projet de recherche.....	43
3.2.1 Conception d'une série de dimères d'androgènes fonctionnalisée en position 7 $\alpha$ .....	43
3.2.2 Conception d'une série de dimères d'androgènes fonctionnalisée en position 17 $\alpha$ .....	48
3.2.3 Évaluation des propriétés biologiques et de l'affinité avec le cytochrome P450 3A4 des nouveaux composés.....	50
CHAPITRE IV RÉSULTATS - PARTIE I.....	52
4.1 Avant-Propos.....	52
4.2 Résumé.....	54
4.3 Abstract.....	55
4.4 Introduction.....	56
4.5 Design and chemistry .....	59
4.6 Results and discussion .....	62
4.6.1 Antiproliferative activity of the new compounds .....	62
4.6.2 Antiandrogenic potential of testosterone dimer ( <b>14<math>\beta</math></b> ) and epitestosterone dimer ( <b>14<math>\alpha</math></b> ).....	64
4.6.3 Interaction of steroid dimers with recombinant CYP3A4.....	68
4.7 Conclusion .....	75
5. Experimental protocols.....	75
5.1 Biological Methods .....	75
5.1.1 Antiproliferative activity assay.....	76
5.1.2 Inhibition of testosterone- and dihydrotestosterone-induced cell proliferation of LNCaP PCa cells by dimers <b>14<math>\alpha</math></b> and <b>14<math>\beta</math></b> .....	76
5.2 Spectral and structural studies on CYP3A4.....	77
5.3 Chemistry.....	78

5.3.1 Synthesis of testosterone and androstenedione dimers .....	79
4.8 Acknowledgments .....	85
4.9 References .....	86
CHAPITRE V RÉSULTATS - PARTIE II.....	90
5.1 Synthèse des dimères de la testostérone fonctionnalisés en 17 $\alpha$ .....	90
5.1.1 Protection et oxydation de la testostérone .....	90
5.1.2 Addition d'un réactif organométallique sur l'androst-4-èn-17-one spiro-(1,3)dioxolane et déprotection.....	91
5.1.3 Dimérisation des précurseurs <b>3</b> <sub>1-6</sub> .....	97
5.2 Synthèse du dimère de DHT fonctionnalisé en 17 $\alpha$ .....	103
5.3 Activité biologique des composés <b>3</b> <sub>1-6</sub> , <b>4</b> <sub>1,4,5</sub> , <b>7</b> , <b>8</b> et du CPA .....	105
5.4 Étude de l'affinité avec le cytochrome P450 3A4.....	108
CHAPITRE VI CONCLUSION.....	113
ANNEXE A .....	118
PARTIE EXPÉRIMENTALE .....	118
A.1 Remarques générales .....	118
A.2 Protocoles expérimentaux .....	119
ANNEXE B1 FIGURE S1, TABLE S1 et SPECTRES RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C DES COMPOSÉS DU CHAPITRE IV.....	141
ANNEXE B2 SPECTRES RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C DES COMPOSÉS DU CHAPITRE V	158
APPENDICE A ARTICLE COMPLÉMENTAIRE.....	195
RÉFÉRENCES .....	227

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Localisation de la prostate dans le corps de l'homme. ....	3
Figure 1.2	Coupes sagittale et coronale de la prostate représentant la zone centrale (CZ), la zone périphérique (PZ) et la zone transitionnelle (TZ). ....	5
Figure 1.3	Formule permettant de calculer la cote de Gleason d'un adénocarcinome de la prostate.....	10
Figure 1.4	Structures moléculaires de la testostérone et de la dihydrotestostérone avec numérotation des carbones. ....	16
Figure 1.5	Schéma de la conversion du cholestérol en hormones stéroïdiennes dans les cellules de Leydig.....	17
Figure 1.6	Représentation des domaines principaux du récepteur des androgènes. ..	18
Figure 1.7	Mécanisme d'action des androgènes. ....	18
Figure 1.8	Représentation des principaux antiandrogènes utilisés en clinique.....	24
Figure 2.1	Représentation des principales composantes d'une molécule dimérique. ....	25
Figure 2.2	Diagramme de flux indiquant les groupes des molécules symétriques selon le système de Schoenflies. ....	28
Figure 2.3	Représentation des principaux types de symétrie présents dans la nature. ....	30
Figure 2.4	Répartition des principaux types de symétrie retrouvés dans la nature.	31
Figure 2.5	Cliché cristallographique et représentation du complexe dimérique RA-DHT. ....	33
Figure 2.6	Modèle d'interaction des androgènes dimériques et des androgènes libres avec le RA. ....	34
Figure 3.1	Première génération de dimères de la testostérone possédant un connecteur moléculaire carboné en position $7\alpha$ .....	38
Figure 3.2	Cliché de diffraction des rayons X du dimère <b>4</b> .....	39

Figure 3.3	Séries de dimères de la testostérone possédant des connecteurs moléculaires de types diesters. ....	41
Figure 3.4	Représentation de la deuxième génération de dimères androgéniques fonctionnalisés en <b>7a</b> . ....	44
Figure 3.5	Simulation tridimensionnelle de la structure du dimère <b>7</b> . ....	45
Figure 3.6	Analyse rétrosynthétique des dimères <b>7</b> , <b>8</b> et <b>9</b> . ....	47
Figure 3.7	Analyse rétrosynthétique des dimères possédant un connecteur moléculaire alcénique en position <b>17a</b> . ....	49
Figure 4.1	TS ( <b>1</b> ) and androstenedione ( <b>2</b> ) with diverse examples of known dimers linked by a silyl ether ( <b>3,4</b> ), diester ( <b>5-7</b> ) or sulfur bridge ( <b>8,9</b> ). ....	57
Figure 4.2	Structure of known isomeric TS dimers ( <i>cis</i> - <b>10</b> and <i>trans</i> - <b>10</b> ) linked by a but-2-ene carbon atom chain. ....	58
Figure 4.3	Inhibition of TS-induced growth of LNCaP PCa cells by <b>14a</b> and <b>14b</b> dimers. ....	65
Figure 4.4	Inhibition of DHT-induced growth of LNCaP PCa cells by <b>14a</b> and <b>14b</b> dimers. ....	66
Figure 4.5	Comparative effects of CPA versus <b>14a</b> or <b>14b</b> dimers on the growth of LNCaP PCa cells. ....	68
Figure 4.6	A-C, Spectral changes in CYP3A4 induced by TS dimers <b>14a</b> , <b>14b</b> and <b>14</b> , respectively. ....	69
Figure 4.7	Crystal structure of CYP3A4 bound to the TS dimer <i>cis</i> - <b>10</b> . ....	72
Figure 4.8	Conformational changes in CYP3A4 induced by <i>cis</i> - <b>10</b> . ....	73
Figure 5.1	États de transition possibles pour un réactif de Grignard allylique. ....	94
Figure 5.2	Représentations de certains catalyseurs à base de ruthénium(II) utilisés pour des réactions de métathèse d'oléfines. ....	99
Figure 5.3	Représentation des dimères <i>trans</i> - <b>9</b> et <i>cis</i> - <b>9</b> . ....	109
Figure S1	<b>A</b> and <b>B</b> , Spectral changes in recombinant CYP3A4 induced by TS dimers <i>cis</i> - <b>10</b> and <i>trans</i> - <b>10</b> , respectively. ....	142

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1	Nomenclature et description des sous-stades du cancer de la prostate...	9
Tableau 1.2	Grades et groupes de grade associé à la classification de Gleason pour les adénocarcinomes de la prostate.....	12
Tableau 2.1	Nomenclature des principaux groupes de symétrie selon la classification d'Hermann-Mauguin. ....	29
Tableau 3.1	Évaluation de l'activité antiproliférative des dimères <b>1</b> et <b>3</b> sur les lignées cellulaires LNCaP et PC3. ....	39
Tableau 3.2	Évaluation de la cytotoxicité des dimères <b>5a</b> à <b>5d</b> sur les lignées cellulaires LNCaP, DU-145 et PC3.....	42
Tableau 4.1	Antiproliférative activity of novel TS dimers (compound <b>14<math>\alpha</math></b> and <b>14<math>\beta</math></b> ) and androstenedione dimer (compounds <b>14</b> ), their respective precursors ( <b>13<math>\alpha</math></b> , <b>13<math>\beta</math></b> and <b>13</b> ), the Diels-Alder adduct <b>15</b> and CPA on androgen-sensitive (LNCaP) and androgen-insensitive (PC3 and DU145) human prostate adenocarcinoma cell lines. ....	63
Tableau 4.2	Interaction of new TS dimers ( <b>14<math>\alpha</math></b> and <b>14<math>\beta</math></b> ), androstenedione dimer ( <b>14</b> ) and previously produced <i>cis</i> - <b>10</b> and <i>trans</i> - <b>10</b> with isolated recombinant CYP3A4. ....	70
Tableau 5.1	Rendements des réactions de Grignard exécutées avec divers bromoalcènes.....	93
Tableau 5.2	Rendements des réactions de dimérisation et proportion des homologues obtenus. ....	101
Tableau 5.3	Activités antiprolifératives des composés vis-à-vis la lignée cellulaire LNCaP (RA+) évaluées par un test MTT. ....	106
Tableau 5.4	Affinité des monomères <b>3<sub>1</sub></b> et <b>7</b> envers le cytochrome P450 3A4.....	110
Tableau 5.5	Affinité des dimères <b>4<sub>1</sub></b> , <b>8</b> et <b>9</b> envers le cytochrome P450 3A4.....	111
Tableau S.1	X-ray data collection and refinement statistics for the <i>cis</i> - <b>10</b> bound CYP3A4.....	143

## LISTE DES SCHÉMAS

Schéma 4.1	Preparation of TS dimers and their precursors.....	60
Schéma 4.2	Preparation of the 4-(17 $\beta$ -hydroxy-4-androsten-3-one-7 $\alpha$ -yl)-3a,4,7,7a-tetrahydro-isobenzofuran-1,3-dione <b>15</b> .....	61
Schéma 5.1	Protection et oxydation de la testostérone.....	90
Schéma 5.2	Addition d'un organométallique et déprotection de l'androst-4-èn-17-one spiro-(1,3)dioxolane.....	92
Schéma 5.3	Phénomènes d'énolisation et de réduction possibles lors d'une réaction entre <b>2</b> et des réactifs de Grignard plus long .....	95
Schéma 5.4	Schéma général d'une réaction de métathèse d'oléfines. ....	98
Schéma 5.5	Synthèse des dimères de testostérone fonctionnalisés en 17 $\alpha$ . ....	100
Schéma 5.6	Mécanisme probable d'isomérisation des précurseurs <b>3</b> <sub>2-6</sub> . ....	102
Schéma 5.7	Schéma de synthèse du dimère de DHT <b>8</b> . ....	104



## LISTE DES SPECTRES

Spectre B1.1 RMN <sup>1</sup> H du 7 $\alpha$ -(buta-1,3-dienyl)-4-androsten-17 $\beta$ -ol-3-one ( <b>13<math>\beta</math></b> ) .....	144
Spectre B1.2 RMN <sup>13</sup> C du 7 $\alpha$ -(buta-1,3-dienyl)-4-androsten-17 $\beta$ -ol-3-one ( <b>13<math>\beta</math></b> ) .....	145
Spectre B1.3 RMN <sup>1</sup> H du 7 $\alpha$ -(buta-1,3-dienyl)-4-androsten-17 $\alpha$ -ol-3-one ( <b>13<math>\alpha</math></b> ) ..	146
Spectre B1.4 RMN <sup>13</sup> C du 7 $\alpha$ -(buta-1,3-dienyl)-4-androsten-17 $\alpha$ -ol-3-one ( <b>13<math>\alpha</math></b> ) .....	147
Spectre B1.5 RMN <sup>1</sup> H du 7 $\alpha$ -(buta-1,3-dienyl)-4-androsten-3,17-dione ( <b>13</b> ) .....	148
Spectre B1.6 RMN <sup>13</sup> C du 7 $\alpha$ -(buta-1,3-dienyl)-4-androsten-3,17-dione ( <b>13</b> ) .....	149
Spectre B1.7 RMN <sup>1</sup> H du <i>trans,trans,trans</i> -1,6-bis-(17 $\beta$ -hydroxy-4-androsten-3-one-7 $\alpha$ -yl)hexatriene ( <b>14<math>\beta</math></b> ) .....	150
Spectre B1.8 RMN <sup>13</sup> C du <i>trans,trans,trans</i> -1,6-bis-(17 $\beta$ -hydroxy-4-androsten-3-one-7 $\alpha$ -yl)hexatriene ( <b>14<math>\beta</math></b> ) .....	151
Spectre B1.9 RMN <sup>1</sup> H du <i>trans,trans,trans</i> -1,6-bis-(17 $\alpha$ -hydroxy-4-androsten-3-one-7 $\alpha$ -yl)hexatriene ( <b>14<math>\alpha</math></b> ) .....	152
Spectre B1.10 RMN <sup>13</sup> C du <i>trans,trans,trans</i> -1,6-bis-(17 $\alpha$ -hydroxy-4-androsten-3-one-7 $\alpha$ -yl)hexatriene ( <b>14<math>\alpha</math></b> ) .....	153
Spectre B1.11 RMN <sup>1</sup> H du <i>trans,trans,trans</i> -1,6-bis-(4-androsten-3,17-dione-7 $\alpha$ -yl)hexatriene ( <b>14</b> ) .....	154
Spectre B1.12 RMN <sup>13</sup> C du <i>trans,trans,trans</i> -1,6-bis-(4-androsten-3,17-dione-7 $\alpha$ -yl)hexatriene ( <b>14</b> ) .....	155
Spectre B1.13 RMN <sup>1</sup> H du 4-(17 $\beta$ -hydroxy-4-androsten-3-one-7 $\alpha$ -yl)-3a,4,7,7a-tetrahydro-isobenzofuran-1,3-dione ( <b>15</b> ) .....	156
Spectre B1.14 RMN <sup>13</sup> C du 4-(17 $\beta$ -hydroxy-4-androsten-3-one-7 $\alpha$ -yl)-3a,4,7,7a-tetrahydro-isobenzofuran-1,3-dione ( <b>15</b> ) .....	157
Spectre B2.1 RMN <sup>1</sup> H de l'androst-4-èn-17 $\beta$ -ol spiro-(1,3)dioxolane ( <b>1</b> ) .....	159
Spectre B2.2 RMN <sup>13</sup> C de l'androst-4-èn-17 $\beta$ -ol spiro-(1,3)dioxolane ( <b>1</b> ) .....	160
Spectre B2.3 RMN <sup>1</sup> H de l'androst-4-èn-17-one spiro-(1,3)dioxolane ( <b>2</b> ) .....	161

Spectre B2.4 RMN <sup>13</sup> C de l'androst-4-èn-17-one spiro-(1,3)dioxolane ( <b>2</b> ) .....	162
Spectre B2.5 RMN <sup>1</sup> H du 17 $\alpha$ -allyl-androst-4-èn-3-one-17 $\beta$ -ol ( <b>3</b> <sub>1</sub> ) .....	163
Spectre B2.6 RMN <sup>13</sup> C du 17 $\alpha$ -allyl-androst-4-èn-3-one-17 $\beta$ -ol ( <b>3</b> <sub>1</sub> ) .....	164
Spectre B2.7 RMN <sup>1</sup> H du 17 $\alpha$ -(but-3-èn-1-yl)-androst-4-èn-3-one-17 $\beta$ -ol ( <b>3</b> <sub>2</sub> ) .....	165
Spectre B2.8 RMN <sup>13</sup> C du 17 $\alpha$ -(but-3-èn-1-yl)-androst-4-èn-3-one-17 $\beta$ -ol ( <b>3</b> <sub>2</sub> ) .....	166
Spectre B2.9 RMN <sup>1</sup> H du 17 $\alpha$ -(pent-4-èn-1-yl)-androst-4-èn-3-one-17 $\beta$ -ol ( <b>3</b> <sub>3</sub> ) .....	167
Spectre B2.10 RMN <sup>13</sup> C du 17 $\alpha$ -(pent-4-èn-1-yl)-androst-4-èn-3-one-17 $\beta$ -ol ( <b>3</b> <sub>3</sub> ) .....	168
Spectre B2.11 RMN <sup>1</sup> H du 17 $\alpha$ -(hex-5-èn-1-yl)-androst-4-èn-3-one-17 $\beta$ -ol ( <b>3</b> <sub>4</sub> ) .....	169
Spectre B2.12 RMN <sup>13</sup> C du 17 $\alpha$ -(hex-5-èn-1-yl)-androst-4-èn-3-one-17 $\beta$ -ol ( <b>3</b> <sub>4</sub> ) .....	170
Spectre B2.13 RMN <sup>1</sup> H du 17 $\alpha$ -(hept-6-èn-1-yl)-androst-4-èn-3-one-17 $\beta$ -ol ( <b>3</b> <sub>5</sub> ) .....	171
Spectre B2.14 RMN <sup>13</sup> C du 17 $\alpha$ -(hept-6-èn-1-yl)-androst-4-èn-3-one-17 $\beta$ -ol ( <b>3</b> <sub>5</sub> ) .....	172
Spectre B2.15 RMN <sup>1</sup> H du 17 $\alpha$ -(oct-7-èn-1-yl)-androst-4-èn-3-one-17 $\beta$ -ol ( <b>3</b> <sub>6</sub> ) .....	173
Spectre B2.16 RMN <sup>13</sup> C du 17 $\alpha$ -(oct-7-èn-1-yl)-androst-4-èn-3-one-17 $\beta$ -ol ( <b>3</b> <sub>6</sub> ) .....	174
Spectre B2.17 RMN <sup>1</sup> H du (( <i>E</i> )-17,17'-(but-2-ène-1,4-diyl))bis(androst-4-èn-3-one-17 $\beta$ -ol) ( <b>4</b> <sub>1</sub> ) .....	175
Spectre B2.18 RMN <sup>13</sup> C du (( <i>E</i> )-17,17'-(but-2-ène-1,4-diyl))bis(androst-4-èn-3-one-17 $\beta$ -ol) ( <b>4</b> <sub>1</sub> ) .....	176
Spectre B2.19 RMN <sup>1</sup> H du (( <i>E</i> )-17,17'-(hex-3-ène-1,6-diyl))bis(androst-4-èn-3-one-17 $\beta$ -ol) ( <b>4</b> <sub>2</sub> ) .....	177
Spectre B2.20 RMN <sup>13</sup> C du (( <i>E</i> )-17,17'-(hex-3-ène-1,6-diyl))bis(androst-4-èn-3-one-17 $\beta$ -ol) ( <b>4</b> <sub>2</sub> ) .....	178
Spectre B2.21 RMN <sup>1</sup> H du (( <i>E</i> )-17,17'-(oct-4-ène-1,8-diyl))bis(androst-4-èn-3-one-17 $\beta$ -ol) ( <b>4</b> <sub>3</sub> ) .....	179
Spectre B2.22 RMN <sup>13</sup> C du (( <i>E</i> )-17,17'-(oct-4-ène-1,8-diyl))bis(androst-4-èn-3-one-17 $\beta$ -ol) ( <b>4</b> <sub>3</sub> ) .....	180

Spectre B2.23 RMN $^1\text{H}$ du (( <i>E</i> )-17,17'-(déca-5-ène-1,10-diyl))bis(androst-4-èn-3-one-17 $\beta$ -ol) ( <b>4<sub>4</sub></b> ).....	181
Spectre B2.24 RMN $^{13}\text{C}$ du (( <i>E</i> )-17,17'-(déca-5-ène-1,10-diyl))bis(androst-4-èn-3-one-17 $\beta$ -ol) ( <b>4<sub>4</sub></b> ).....	182
Spectre B2.25 RMN $^1\text{H}$ du (( <i>E</i> )-17,17'-(dodéca-6-ène-1,12-diyl))bis(androst-4-èn-3-one-17 $\beta$ -ol) ( <b>4<sub>5</sub></b> ).....	183
Spectre B2.26 RMN $^{13}\text{C}$ du (( <i>E</i> )-17,17'-(dodéca-6-ène-1,12-diyl))bis(androst-4-èn-3-one-17 $\beta$ -ol) ( <b>4<sub>5</sub></b> ).....	184
Spectre B2.27 RMN $^1\text{H}$ du (( <i>E</i> )-17,17'-(tétradéca-7-ène-1,14-diyl))bis(androst-4-èn-3-one-17 $\beta$ -ol) ( <b>4<sub>6</sub></b> ).....	185
Spectre B2.28 RMN $^{13}\text{C}$ du (( <i>E</i> )-17,17'-(tétradéca-7-ène-1,14-diyl))bis(androst-4-èn-3-one-17 $\beta$ -ol) ( <b>4<sub>6</sub></b> ).....	186
Spectre B2.29 RMN $^1\text{H}$ de l'androst-17 $\beta$ -ol spiro-(1,3)dioxolane ( <b>5</b> ).....	187
Spectre B2.30 RMN $^{13}\text{C}$ de l'androst-17 $\beta$ -ol spiro-(1,3)dioxolane ( <b>5</b> ).....	188
Spectre B2.31 RMN $^1\text{H}$ de l'androst-17-one spiro-(1,3)dioxolane ( <b>6</b> ).....	189
Spectre B2.32 RMN $^{13}\text{C}$ de l'androst-17-one spiro-(1,3)dioxolane ( <b>6</b> ).....	190
Spectre B2.33 RMN $^1\text{H}$ du 17 $\alpha$ -allyl-androst-3-one-17 $\beta$ -ol ( <b>7</b> ).....	191
Spectre B2.34 RMN $^{13}\text{C}$ du 17 $\alpha$ -allyl-androst-3-one-17 $\beta$ -ol ( <b>7</b> ).....	192
Spectre B2.35 RMN $^1\text{H}$ du (( <i>E</i> )-17,17'-(but-2-ène-1,4-diyl))bis(androst-3-one-17 $\beta$ -ol) ( <b>8</b> ).....	193
Spectre B2.36 RMN $^{13}\text{C}$ du (( <i>E</i> )-17,17'-(but-2-ène-1,4-diyl))bis(androst-3-one-17 $\beta$ -ol) ( <b>8</b> ).....	194

## LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ADN	Acide désoxyribonucléique
AGF	Addition de groupement fonctionnel
ARN	Acide ribonucléique
C	Carbone
CCM	Chromatographie sur couche mince
CDCl <sub>3</sub>	Chloroforme deutéré
CPA	Acétate de cyprotérone
CRPC	Cancer de la prostate androgéno-résistant ( <i>Castration Resistant Prostate Cancer</i> )
CYP3A4	Cytochrome P450 3A4
éq.	Équivalent
d	Doublet (RMN)
dd	Doublet de doublet (RMN)
DBD	Domaine de liaison de l'ADN
DCM	Dichlorométhane
DHT	Dihydrotestostérone
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde

ERO	Espèce réactive de l'oxygène
HCl	Acide chlorhydrique
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
HSP	Protéine de choc thermique
IC <sub>50</sub>	Concentration inhibitrice à 50 %
IGF	Interconversion de groupement fonctionnel
IR	Infrarouge
J	Constante de couplage (RMN)
LBD	Domaine de liaison du ligand
LH	Hormone lutéinisante
m	Multiplet (RMN)
Me	Méthyle
MeOH	Méthanol
N	Azote
NBS	<i>N</i> -Bromosuccinimide
O	Oxygène
PARP	Poly(ADN-ribose) polymérase
PSA	Antigène prostatique spécifique
RA	Récepteur des androgènes
RMN	Résonance magnétique nucléaire
s	Singulet (RMN)
sl	Singulet large (RMN)

SMHR	Spectrométrie de masse haute résolution
SRB	Sulforhodamine B
t	Triplet (RMN)
TEA	Triéthylamine
THF	Tétrahydrofurane

## LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

$\alpha$	Alpha
Å	Angström
$\beta$	Bêta
°C	Degré Celsius
$\delta$	Delta, déplacement chimique
g	Gramme
h	Heure
Hz	Hertz
J	Constante de couplage en Hz (RMN)
M	Molaire
N	Normale
mg	Milligramme
min	Minute
mL	Millilitre
mmol	Millimole
mol	Mole
ppm	Partie par million
$\mu\text{M}$	Micromolaire

## RÉSUMÉ

Le cancer de la prostate est le 4<sup>e</sup> cancer le plus diagnostiqué au Canada. Il est dit qu'un homme sur 8 recevra un diagnostic de cancer de la prostate au cours de sa vie et qu'au Québec, 20% de ces hommes en succomberont, selon la fédération québécoise du cancer. Un problème majeur dans le traitement de ce cancer est l'action proliférative qu'exercent les androgènes sur les tissus cancéreux. Ce projet consiste à synthétiser des dimères de la testostérone pouvant agir comme bloqueurs hormonaux vis-à-vis les hormones androgéniques telles que la testostérone et la dihydrotestostérone. Ce type de bloqueur hormonal fut déjà synthétisé par le laboratoire dans le passé et l'un des candidats présenta des résultats biologiques très intéressants, il s'est avéré être 1,4 fois plus actif que l'acétate de cyprotérone sur les cellules de la lignée LNCaP (RA+). Le motif structural de ce candidat consiste en deux unités testostérone reliées ensemble à la position 7 $\alpha$  par une chaîne but-2-ène. Le présent projet de recherche consiste à élaborer une deuxième génération de ce type de dimère, où les unités stéroïdes sont reliées entre elles par une chaîne moléculaire de type triène, en position 7 $\alpha$ . Un objectif secondaire du projet porte sur l'élaboration d'une nouvelle série de dimères d'androgènes, cette dernière comportant une chaîne liante alcénique en position 17 $\alpha$ . Ce document présente le design des nouvelles molécules, le détail chimique de leurs conceptions ainsi que les résultats *in vitro* concernant leurs activités biologiques. L'interaction des dimères avec le cytochrome P450 3A4 est également discutée.

Mots-clés : Cancer de la prostate, hormonothérapie, dimères stéroïdiens, testostérone, récepteurs des androgènes.



## INTRODUCTION

Dans l'histoire de la médecine moderne, le potentiel létal du cancer est bien établi et documenté. À eux seuls, les cancers sont le type de trouble de la santé le plus mortel du monde entier avec 9,6 millions de morts en 2018 selon l'OMS, ce qui rend cette maladie plus fatale que l'insuffisance coronarienne et l'accident vasculaire cérébral. Au Canada, la Société canadienne du cancer estime qu'à chaque heure qui passait en 2021, 10 Canadiens mouraient des suites d'un cancer. Elle note que ce sont les cancers du poumon, le cancer colorectal, le cancer du sein ainsi que le cancer de la prostate qui sont les plus fréquents chez les Canadiens. C'est d'ailleurs le cancer de la prostate qui serait le plus fréquent chez l'homme, représentant environ un cinquième de tous les nouveaux cas de cancer masculin diagnostiqués. Bien que les ressources médicales modernes sont de plus en plus raffinées pour traiter ce type de cancer, le *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) rappelle que les difficultés thérapeutiques liées au traitement du cancer de la prostate surviennent généralement lors de l'apparition de métastases cancéreuses pour les cancers de stade 3 et 4. Une de ces complications est entre autres la stimulation de la croissance des tissus cancéreux par l'intermédiaire d'hormones présentes dans le corps, telle que la testostérone qui est susceptible d'accroître dramatiquement la vitesse de développement d'un cancer de la prostate. Une avenue thérapeutique pour contrer ce problème implique l'utilisation de bloqueurs hormonaux qui inhibent l'action des androgènes, ce qui permet de diminuer la vitesse d'accroissement des tissus cancéreux. Ce projet de maîtrise consiste à synthétiser une série de molécules possédant la propriété de limiter le développement du cancer de la prostate en perturbant l'effet des androgènes dans le corps de l'homme. Accessoirement, les molécules synthétisées ont pu être utilisées en tant que sondes

moléculaires afin d'étudier la conformation du site actif du cytochrome P450 3A4. L'ensemble des résultats entourant cette problématique sera également discuté.

La première partie de ce mémoire expose les principales notions théoriques utiles pour comprendre la biologie générale et le développement du cancer de la prostate. La deuxième partie expliquera quant à elle le rôle et le mécanisme d'action des stéroïdes dimériques dans une perspective hormonothérapeutique contre le cancer de la prostate. La partie suivante présentera clairement la question de recherche du projet et fera état des travaux précédemment effectués dans le domaine. La rationalisation du design moléculaire des nouveaux candidats sera discutée en détail. Ensuite, les chapitres IV et V contiendront les résultats sur la synthèse des nouvelles molécules, leurs potentiels biologiques et leur affinité pour le cytochrome P450 3A4. Les résultats du chapitre IV sont tirés d'un article scientifique ayant été publié dans le cadre de ce projet de maîtrise. Enfin, les principaux constats ayant été dégagés de la recherche ci-présente seront mis en exergue dans une conclusion qui émettra également des pistes quant aux futurs travaux qui pourraient découler des résultats contenus dans ce mémoire.

## CHAPITRE I

### ASPECTS BIOLOGIQUES ET MOLÉCULAIRES DU CANCER DE LA PROSTATE

#### 1.1 Anatomie et physiologie de la prostate

La prostate est une glande exocrine masculine se trouvant en plein cœur de la cavité pelvienne [1]. Située sous la vessie et devant le rectum, cette glande de forme conique est composée de deux lobes principaux (droit et gauche) et de 5 faces : la face basale, antérieure, postérieure, inférolatérale gauche et inférolatérale droite. La prostate fait également le lien entre les vésicules séminales et l'urètre (Figure 1.1).

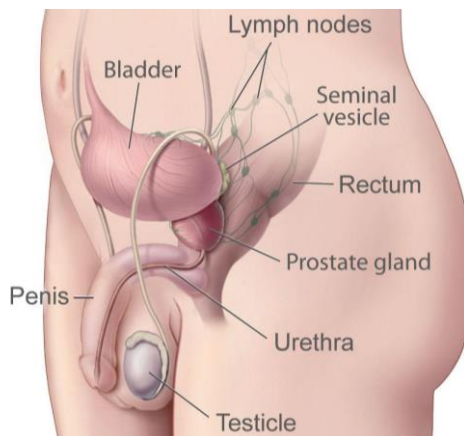


Figure 1.1 Localisation de la prostate dans le corps de l'homme (Tiré de <https://www.cancer.gov/types/prostate/understanding-prostate-changes>).

D'un point de vue urologique, la prostate est une glande possédant de multiples rôles. De par sa localisation dans l'organisme, elle participe d'abord au contrôle du débit de l'excrétion de l'urine et de l'éjection du sperme lors de l'éjaculation [2]. La prostate participe également à la composition du sperme puisqu'elle sécrète le fluide prostatique, un liquide représentant 20 à 30% du volume final du sperme [3]. Ce fluide contient du zinc(II), du citrate, du glucose, des kallicroïnes, des phosphatases et des polyamines.

Le citrate du fluide prostatique permet d'alcaliniser le pH de l'urètre, et donc de minimiser la dégradation des spermatozoïdes lors de l'éjaculation [2]. Les phosphatases permettent d'hydrolyser la phosphorylcholine en choline, qui peut alors nourrir les spermatozoïdes, tout comme le glucose. Les polyamines, quant à elles, jouent un rôle dans la mobilité des spermatozoïdes [4]. Les kallicroïnes sont un groupe de protéases à sérine jouant un rôle dans la liquéfaction du sperme. Après l'éjaculation, les séménogélines, originellement produites par la vésicule séminale, coagulent avec les fibronectines présentes dans la matrice extracellulaire. Les kallicroïnes, notamment l'antigène prostatique spécifique (PSA), participent à la protéolyse de ces agrégats, permettant aux spermatozoïdes de poursuivre leurs chemins vers les trompes de Fallope. Aussi, le rôle du zinc(II) dans le liquide prostatique est double : il permet d'inhiber la conversion du citrate en isocitrate par le cycle de Krebs et il permet de moduler l'action liquéfactive des kallicroïnes. En effet, le zinc(II) peut se lier de manière réversible sur des sites allostériques du PSA et des autres kallicroïnes, ce qui les inactive. Toutefois, le zinc(II) a une plus grande affinité pour les séménogélines. Ainsi, une fois le liquide prostatique et le liquide séminal mélangés lors de l'éjaculation, le zinc(II) se lie aux séménogélines, ce qui permet au PSA de dégrader les amas protéiques et de libérer les spermatozoïdes [3]. Les peptides résultants de la dégradation de ces agrégats et le zinc(II) résiduel peuvent par la suite jouer certains rôles dans la survie des spermatozoïdes, notamment en tuant les bactéries se trouvant

dans le vagin [5]. La prostate joue donc un rôle important dans la composition du sperme, dans la mobilité des spermatozoïdes ainsi que dans leurs maturations.

### 1.1.1 Structures histologiques

La prostate possède trois zones histologiques principales: la zone centrale, la zone périphérique et la zone transitionnelle (Figure 1.2).

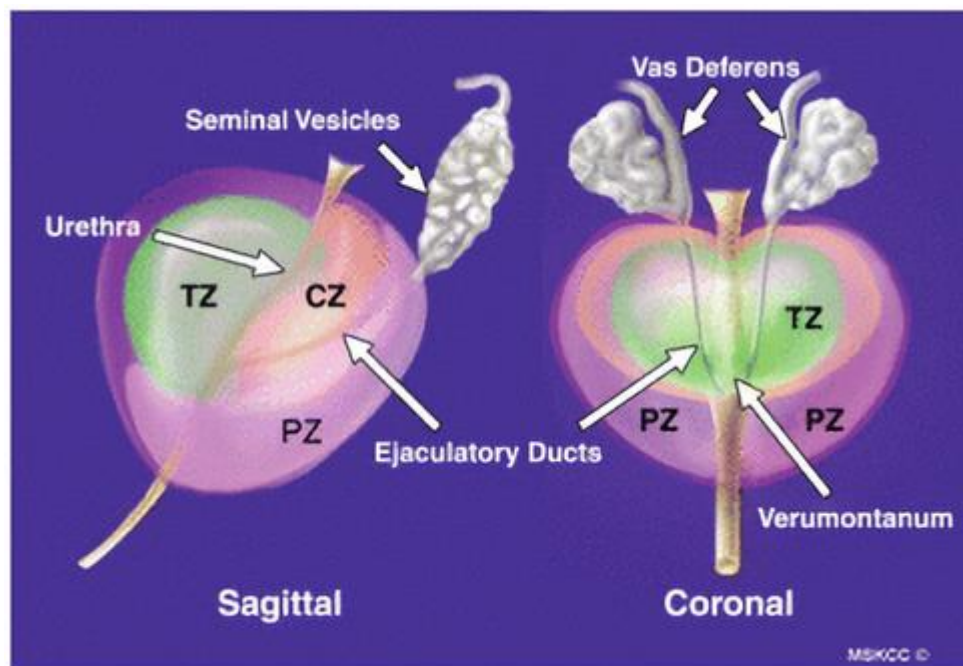


Figure 1.2 Coupes sagittale et coronale de la prostate représentant la zone centrale (CZ), la zone périphérique (PZ) et la zone transitionnelle (TZ) (Tiré de <https://sperlingprostatecenter.com/prostate-zone-anatomy-prostate-cancer-and-imaging/>).

Ces trois sections possèdent des compositions et des fonctions différentes. La zone centrale représente environ 25% de la masse totale de la prostate et est située autour du conduit séminal [6]. Durant l'urination, les muscles de la zone centrale se contractent,

empêchant ainsi l'urine de monter dans les vésicules séminales. Cette zone est essentiellement composée d'un stroma fibromusculaire, de cellules sécrétoires arrangées de manière éparses et de quelques cellules basales. La zone périphérique, quant à elle, est la zone la plus importante de la prostate, représentant près de 70% de la masse de cette dernière [6]. Cette zone recouvre presque totalement les deux autres et englobe la plupart des canaux biologiques. Il s'agit de la zone possédant le plus de tissu glandulaire. La zone transitionnelle entoure la partie de l'urètre qui traverse la prostate. Cette zone possède une activité glandulaire beaucoup moins importante que les zones centrales et périphériques [7]. Hors de ces trois zones existe également le stroma fibromusculaire antérieur, un amas de tissus musculaires et conjonctifs entourant l'apex de la prostate. Cette formation musculaire ne contient aucune glande [8]. Enfin, il existe également la région des glandes périurétrales, située au cœur du sphincter pré prostatique [6]. Cette section est notamment responsable de la synthèse du PSA [9].

## 1.2 Cancer de la prostate

Un cancer est un amas de cellules ayant subi une ou plusieurs mutations entraînant une croissance rapide et anarchique de ces dernières [10]. Lorsque ce phénomène se produit, les cellules cancéreuses ne font plus leurs fonctions biologiques normales et entraînent des complications médicales, voire le décès du patient, par plusieurs mécanismes tels que : blocage de certains canaux biologiques, obstruction des vaisseaux sanguins et dommages aux tissus entraînant des infections. Les cancers ne répondent pas non plus aux signaux du corps devant entraîner la mort cellulaire programmée (l'apoptose), ce qui pousse les tumeurs à croître sans arrêt [11]. Dans le cas du cancer de la prostate, les problèmes majeurs surviennent souvent lorsque le cancer se répand dans l'organisme sous forme de métastase [12]. Avec plus de 160 000 nouveaux cas diagnostiqués chaque année aux États-Unis, le cancer de la prostate est

l'un des cancers masculins les plus fréquents au monde et ses complications en font l'un des cancers des plus mortels [13].

### 1.2.1 Types de cancer

Il existe plusieurs types de cancer de la prostate, le plus courant étant l'adénocarcinome acinaire. Un adénocarcinome est une tumeur maligne développée dans un épithélium glandulaire. Les cellules acinaires de la prostate sont les cellules pouvant participer à la sécrétion du fluide prostatique. Ce type de cancer entraîne notamment une hausse du taux de PSA dans la prostate [14]. La zone périphérique étant la zone possédant la plus importante activité glandulaire, environ 70% des adénocarcinomes acinaires se retrouvent dans cette zone [15]. Il est à noter que ce cancer représente entre 90% et 95% de tous les cancers de la prostate diagnostiqués [16].

Bien qu'ils soient plus rares, il existe plusieurs autres types de cancer de la prostate. L'adénocarcinome prostatique ductal de la prostate est une forme plus rare et plus agressive de l'adénocarcinome acinaire. Cette maladie se forme à partir des cellules situées en périphéries des divers canaux qui traversent la prostate. L'adénocarcinome prostatique ductal n'entraîne pas nécessairement une hausse du PSA et est plus difficilement détectable [14]. Il est également possible de retrouver certains types de tumeurs neuroendocrines. Ces tumeurs se forment à partir des glandes neuroendocrines présentes dans la prostate. Une des formes les plus agressives de ce type de cancer est le carcinome à petites cellules de la prostate. Ce type de cancer se développe à partir des petites cellules rondes du système neuroendocrinien et représente entre 0,5% à 1% de tous les cas de cancer de la prostate [17]. Un autre genre de cancer est le carcinome des cellules transitionnelles. Il s'agit d'un carcinome originaire de la vessie ou de l'urètre qui peut s'étendre après un certain temps aux tissus de la prostate. Cette affection peut également débuter dans la prostate et s'étendre par la suite au système urinaire [18].

Une autre classe de tumeur pouvant atteindre la prostate est le carcinome squameux, un cancer se répandant dans les cellules plates se trouvant autour de la prostate. Ce type de cancer croît rapidement et est connu pour générer des métastases aux os, au foie et aux poumons [19]. Aussi, une autre forme rare de tumeur est le sarcome prostatique. Les sarcomes naissent dans les tissus mous ou osseux. Les sarcomes de la prostate se développent dans les muscles et les tissus nerveux entourant la prostate ou directement dans le mésenchyme non épithélial du stroma prostatique. Ce type de cancer est très agressif bien que très rare, il représenterait environ 0,1% de tous les cas de cancers de la prostate [20]. Enfin, un des cas les plus rares de cancer de la prostate est le mélanome primaire de la prostate. Un mélanome provient des cellules produisant les pigments de la peau (les mélanocytes). Les mélanomes primaires de la prostate prendraient naissance dans l'épithélium de la zone transitionnelle de la prostate. En 2015, seulement 5 cas de ce cancer étaient rapportés dans la littérature [21].

### 1.2.2 Classification et gradation

Les adénocarcinomes étant le principal type de cancer de la prostate, une classification du stade évolutif fut mise en place pour cette maladie. La médecine compte présentement 4 stades pour classifier ces cancers, le stade 1 étant le stade le plus bénin et le stade 4 le plus mortel. Au premier stade (T1), la tumeur est indétectable par palpation. Au deuxième stade (T2), la tumeur est palpable ou visible par imagerie. Elle peut également s'étendre et affecter les deux lobes principaux de la prostate. Au troisième stade (T3), le cancer atteint maintenant le col de la vessie, les vésicules séminales ou tout autre tissus adjacent. Finalement, au quatrième stade (T4), des métastases ont atteint des endroits éloignés du corps [22]. Chacun de ces stades possède plusieurs sous-stades (Tableau 1.1).



### Stades et sous-stades évolutifs des adénocarcinomes de la prostate

Stade 1		Stade 2		Stade 3		Stade 4	
Sous-stade	Définition	Sous-stade	Définition	Sous-stade	Définition	Sous-stade	Définition
T0	Tumeur non-délectable	T2a	La tumeur atteint la moitié d'un lobe ou moins	T3a	Extension du cancer hors de la prostate	N1	Métastases aux ganglions lymphatiques régionaux
T1a	5% de tissus cancéreux lors d'une résection transurétrale	T2b	La tumeur atteint plus de la moitié d'un lobe	T3b	Invasion des vésicules séminales	M1a	Métastases aux ganglions lymphatiques non régionaux
T1b	>5% de tissus cancéreux lors d'une résection transurétrale	T2c	La tumeur atteint les deux lobes			M1b	Métastases aux os
T1c	Tumeur identifiable par une aiguille à biopsie					M1c	Autres sites possédant des métastases

Tableau 1.1 Nomenclature et description des sous-stades du cancer de la prostate (Adapté de [22]).

Il est également possible de déterminer le grade d'un cancer de la prostate à l'aide de la classification de Gleason. Cette gradation unique pour le cancer de la prostate est utilisée dans le cas d'un adénocarcinome. Elle sert à illustrer le degré de différenciation des cellules cancéreuses et la façon dont ces cellules croissent dans la prostate [23]. La gradation est effectuée de la manière suivante : après une biopsie et un examen au

microscope, le pathologiste identifie les deux modèles de croissance prédominants dans le cancer du patient. Le pathologiste donne ensuite une note entre 3 et 5 pour chacun à deux types de modèles (une cote de 2 ou moins est souvent trop difficile à évaluer cliniquement). Cette note est basée sur la disposition de ces cellules dans la prostate. Si les cellules sont placées dans une conformation semblable aux cellules saines, la cote pour ce type de modèle sera bas. Si ce n'est pas le cas, la cote sera plus élevée. Les cotes des deux modèles sont ensuite additionnées afin de donner une note sur 10. Si le cancer du patient possède plus de deux modèles de croissance, le modèle possédant de grade le plus élevé est additionné au modèle de croissance le plus courant identifié lors de l'examen histologique, ceci fait en sorte que la cote de Gleason est toujours sur 10 (Figure 1.3). Un cancer possédant une cote de 6 ou moins est considéré comme étant bien différencié, alors qu'un cancer possédant une cote plus haute sera plus difficile à traiter [24].

$$\left( \begin{array}{l} \text{Cote du modèle de croissance} \\ \text{le plus courant (entre 3 et 5)} \end{array} \right) + \left( \begin{array}{l} \text{Cote du modèle de croissance} \\ \text{le plus élevé (entre 3 et 5)} \end{array} \right) = \text{Cote de Gleason (sur 10)}$$

Figure 1.3 Formule permettant de calculer la cote de Gleason d'un adénocarcinome de la prostate.

La cote de Gleason qui fut calculée pour un cancer de la prostate donne de l'information sur le pronostic de la maladie, mais également sur les motifs spécifiques de répartitions des cellules cancéreuses et des complications que ces derniers peuvent entraîner pour le patient. Selon la façon dont la cote de Gleason fut calculée, il est possible d'assigner un grade à cette dernière et ainsi de classifier d'une manière plus précise le cancer d'un patient et d'identifier les risques et les contraintes médicales qui y sont associés (Tableau 1.2).

### Classification de la cote de Gleason

Groupe de grade	Cote de Gleason	Grade	Description
1	3 + 3 = 6 ou moins de 6	bas	<p>Les cellules cancéreuses sont bien différenciées, ce qui signifie que leur apparence, leur comportement et leur disposition ressemblent beaucoup à ceux des cellules normales de la prostate. Les glandes de la prostate sont visibles.</p> <p>Le cancer se développe très lentement et ne nécessite souvent aucun traitement.</p>
2	3 + 4 = 7	Intermédiaire bas	<p>Les cellules cancéreuses sont modérément différenciées, ce qui signifie qu'elles sont différentes des cellules normales, mais qu'elles ne sont pas aussi anormales que les cellules peu différenciées ou indifférenciées.</p> <p>Le cancer peut se développer très lentement et ne nécessite parfois aucun traitement.</p>
3	4 + 3 = 7	Intermédiaire élevé	<p>Les cellules cancéreuses sont modérément différenciées, ce qui signifie qu'elles sont différentes des cellules normales, mais qu'elles ne sont pas aussi anormales que les cellules peu différenciées ou indifférenciées.</p> <p>Le cancer se développe à un rythme modéré et doit habituellement être traité.</p>
4	4 + 4 = 8	élevé	<p>Les cellules cancéreuses sont peu différenciées. Leur apparence, leur comportement et leur disposition sont très différents de ceux des cellules normales de la prostate. Les glandes de la prostate ne sont pas visibles ou sont difficiles à bien voir.</p> <p>Le cancer se développe rapidement et risque davantage de se propager.</p>
5	9 ou 10	très élevé	<p>Les cellules cancéreuses sont indifférenciées, ce qui signifie qu'elles sont très anormales. Leur apparence, leur comportement et leur disposition sont très différents de ceux des cellules normales de la prostate. Les glandes de la prostate ne sont pas visibles ou sont difficiles à bien voir.</p> <p>Le cancer se développe très rapidement et risque davantage de se propager. Le pronostic est sombre.</p>

Tableau 1.2 Grades et groupes de grade associés à la classification de Gleason pour les adénocarcinomes de la prostate (Adapté de <https://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/prostate/grading/?region=pe>).

### 1.3 Causes, développement et croissance cellulaire du cancer

Plusieurs altérations de l'ADN peuvent entraîner des mutations cellulaires qui résulteront en un cancer de la prostate. Deux familles de gènes sont principalement en cause lors des cas de mutation menant à un adénocarcinome de la prostate : les gènes oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs. Les gènes oncogènes sont des gènes renfermant de l'information qui permet aux cellules de se diviser, de se maintenir en vie et de croître, alors que les gènes suppresseurs de tumeurs sont des gènes participant au bon contrôle du développement cellulaire, à la réparation des cellules possédant de l'ADN endommagé ou à l'apoptose des cellules mutantes [25]. Il est aisé de concevoir que si des mutations entraînent une suractivation des oncogènes et une suppression des gènes suppresseurs de tumeurs, il est probable que des cellules commencent à se multiplier de manière chaotique, causant ainsi un cancer.

#### 1.3.1 Principales anomalies génétiques associées au cancer de la prostate

Il est d'abord à noter que les quatre types de mutations ponctuelles, soit l'inversion, la délétion, l'insertion et la substitution de nucléotides, peuvent tous participer à la mutation d'un gène qui est susceptible de causer un adénocarcinome de la prostate. Des mutations chromosomiques, impliquant des modifications génomiques par l'intermédiaire d'une ou de plusieurs irrégularités dans une série de nucléotides située sur un chromosome, peuvent également être impliquées dans le développement du cancer [26]. Les mutations génétiques peuvent être héréditaires ou causées par des facteurs exogènes ou endogènes. Il est estimé que seulement entre 5% et 10% des cancers de la prostate ont une mutation héréditaire comme cause majeure [27]. Les

mutations de l'ADN sont plus souvent acquises. Aussi, il existe d'autres facteurs épigénétiques pouvant mener à un cancer de la prostate, tel que la méthylation de l'ADN et la régulation de l'impression génomique, c'est-à-dire l'activation ou l'inactivation sélective des gènes provenant de la mère ou du père [26].

Il existe certains gènes qui sont reconnus pour leur implication dans la genèse et le développement d'un adénocarcinome de la prostate. Par exemple, le gène ATBF1 est un gène situé sur la bande q22 du chromosome 16 qui participe à la suppression tumorale. Or, ce gène est fréquemment sujet à de la délétion. Il a été démontré qu'une délétion de 21 ou 24 nucléotides a été détectée dans la région codante de lignées germinales de patients aux prises avec un cancer de la prostate [28]. Ce gène serait donc impliqué dans le développement de ce cancer. Des erreurs ponctuelles dans les gènes suppresseurs de tumeurs BRCA1, BRCA2, CDKN1B, CHEK2, ANXA7 et EPHB2 sont également associés au développement d'un adénocarcinome de la prostate [29-34]. Du côté des oncogènes, MYC est un des gènes les plus impliqués dans l'évolution du cancer de la prostate. Ce gène proto-oncogène est souvent amplifié et surexprimé dans ce type de cancer, notamment à cause de gains dans certaines régions du bras long du chromosome 8, tels que 8q24 et 8q21 [35]. Les trois oncogènes RAS (HRAS, KRAS et NRAS) sont également sujets à des mutations ponctuelles qui entraînent la prolifération incontrôlée des cellules [36]. Plusieurs autres mutations de gènes suppresseurs de tumeurs ou d'oncogènes sont connues pour avoir un impact dans la croissance tumorale [26].

D'autres mutations génétiques ont un impact plus ou moins direct dans l'évolution d'un adénocarcinome de la prostate. Par exemple, des altérations sur les gènes CYP17, CYP11B1 et CYP3A4 peuvent entraîner des changements dans l'expression de ces gènes qui auront des conséquences sur l'évolution de la maladie [37]. Les gènes CYP codent des protéines appartenant à la superfamille des cytochromes P450, des hémoprotéines participant à des réactions d'oxydoréduction dans l'organisme. Une

surexpression ou une sous-expression de ces protéines peut avoir une certaine incidence sur le cancer de la prostate, car ces dernières interviennent dans le métabolisme des androgènes, qui ont un impact direct sur l'évolution des cellules de la prostate hormonodépendantes. Par exemple, le cytochrome P450c17 alpha régit l'hydroxylation du C-17 et la lyase des C-17 et C-20 dans la biosynthèse des androgènes, alors que le cytochrome P4503A4 est responsable de l'oxydation de la testostérone. Un changement dans l'expression de ces protéines peut donc avoir un impact considérable sur la progression du cancer de la prostate [38,39]. Aussi, les gènes encodant les glutathion S-transférases, tels que GSTP1, GSTM1 et GSTT1, sont susceptibles de causer le cancer s'ils mutent. En effet, les glutathion S-transférases jouent un rôle important dans la stabilisation des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Si l'expression de ces enzymes est modifiée, l'organisme peut être davantage sujet à du stress oxydatif qui peut mener à des altérations génomiques, causant un cancer de la prostate [40]. Finalement, des mutations dans des régions codantes de l'ADN mitochondrial peuvent avoir des impacts sur le cancer de la prostate. En effet, le peu d'histones et la faible capacité de réparation de l'ADN mitochondrial rendent cet ADN susceptible de muter avec le temps, ce qui peut avoir des impacts sur le métabolisme énergétique et ultimement sur le cancer de la prostate. Ces mutations ponctuelles peuvent entraîner une inhibition de la phosphorylation oxydative, ce qui stimule la production des ERO, provoquant ainsi un environnement oxydant propice à causer des mutations ponctuelles de l'ADN pouvant mener à un adénocarcinome de la prostate [41].

### 1.3.2 Épidémiologie

Outre les altérations génomiques, plusieurs facteurs épidémiologiques démontrent que certaines populations sont plus à risques de développer un cancer de la prostate. Tout d'abord, la vieillesse semble être un facteur important. Il a été démontré que les hommes américains caucasiens âgés de 75 à 79 ans ont 130 fois plus de chance d'être

atteint d'un cancer de la prostate que les hommes âgés de 45 à 49 ans [42]. L'origine ethnique est également un facteur épidémiologique bien établi. Aux États-Unis d'Amérique, le cancer de la prostate est 66% plus commun et deux fois plus meurtrier chez les hommes noirs que chez les hommes blancs [43]. Or, les hommes noirs en Afrique affichent des taux très bas de cancers de la prostate, de même que les hommes chinois et japonais [42,44]. Aussi, les hommes avec un historique familial où un parent au premier degré (père, frère ou fils) ayant subi un cancer de la prostate sont plus susceptibles d'en développer un eux-mêmes au cours de leur vie [45].

La diète semble également avoir une certaine importance par rapport au risque de développer un cancer de la prostate. Il a été démontré qu'une diète riche en produits laitiers, en viande rouge, en gras animal et qu'une grande consommation de calcium (900 mg/jour) accroîtrait le risque de développer ce cancer, alors qu'un apport quotidien en vitamine D, en vitamine E, en fructose et en sélénium diminuerait ce risque [46]. Aussi, une consommation suffisante en lycopène, en caroténoïdes et en rétinol pourrait également diminuer ce risque [47,48]. Par ailleurs, deux études de cas démontrent un risque accru de ce type de cancer lorsqu'une concentration élevée en IGF-I (somatomédine C) circule dans le sang [49,50]. Enfin, le poids, la morphologie, la consommation de tabac et le niveau d'activité physique d'un individu auraient tous une incidence sur la genèse, la croissance et le potentiel létal d'un cancer de la prostate [51-53].

### 1.3.3 Androgènes et hormonodépendance

Les cellules cancéreuses, comme les cellules saines, peuvent recevoir des signaux qui stimulent leur différenciation et leur croissance. Bien qu'une panoplie de ces signaux existent, les hormones constituent l'un des types de molécules le plus souvent utilisés dans la signalisation intercellulaire. Par définition, les hormones sont des substances chimiques sécrétées dans le sang afin d'agir sur des tissus plus ou moins éloignés,

souvent dans une perspective régulatoire [54]. Les cellules de la prostate sont très sensibles aux hormones sexuelles masculines, aussi appelées androgènes. Les androgènes sont des composés stéroïdiens qui envoient des signaux à différents tissus de l'organisme. Dans la prostate, les androgènes participent au développement embryonnaire, à la croissance, à la maturation et à la maintenance structurelle et fonctionnelle des cellules [55]. Les principaux androgènes présents dans le corps de l'homme sont la testostérone et la dihydrotestostérone [56] (Figure 1.4).

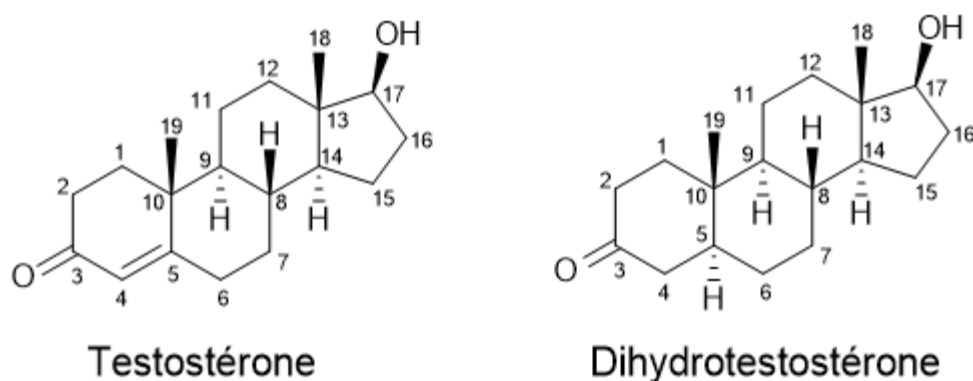


Figure 1.4 Structures moléculaires de la testostérone et de la dihydrotestostérone avec numérotation des carbones.

En ce qui a trait à la synthèse des androgènes, la testostérone est d'abord produite dans les testicules. Des réactions enzymatiques ayant lieu dans le cytoplasme des cellules de Leydig permettent de synthétiser la testostérone à partir du cholestérol. Ces réactions enzymatiques sont réalisées par l'intermédiaire des enzymes P450<sub>scc</sub> (CYP11A1), P450<sub>c17</sub> (CYP17A1), 17 $\beta$ -hydroxystéroïde déhydrogénase et du complexe 3 $\beta$ -hydroxystéroïde déhydrogénase/ $\Delta^{4,5}$ isomérase. D'autres protéines peuvent également intervenir dans la séquence enzymatique afin de générer plusieurs hormones stéroïdiennes [57] (Figure 1.5).



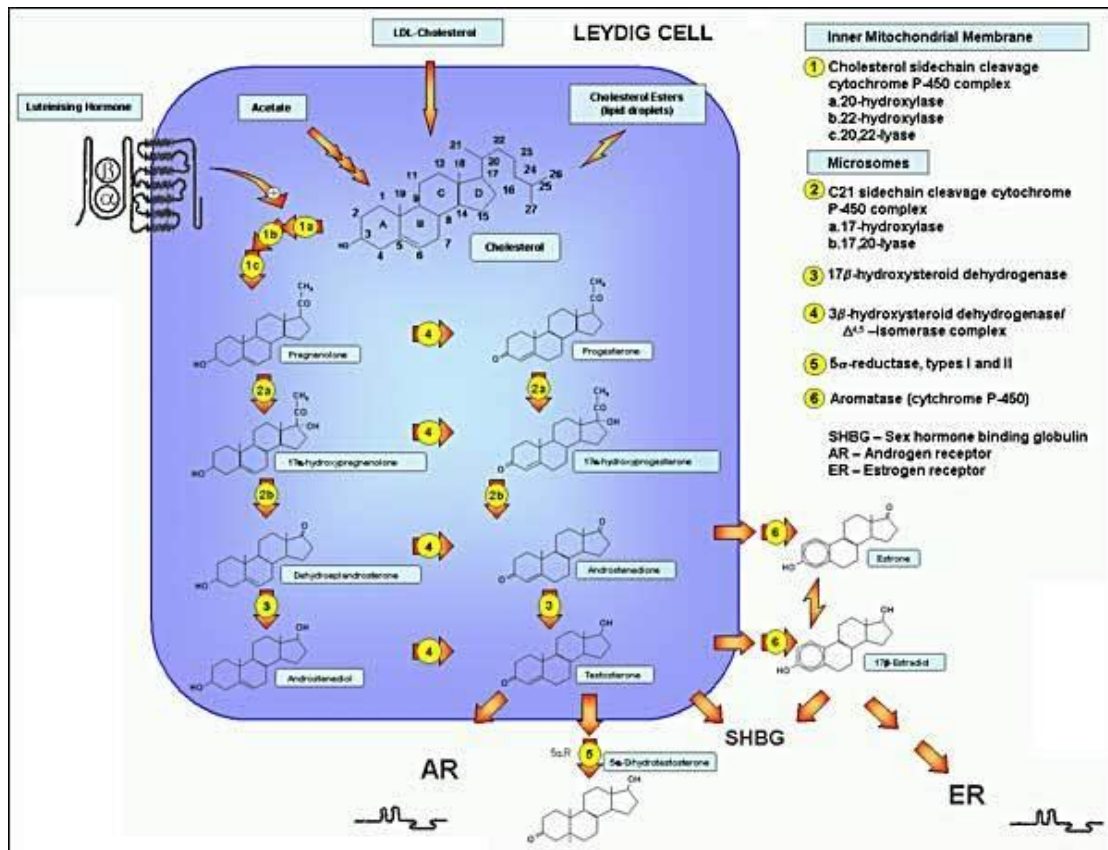


Figure 1.5 Schéma de la conversion du cholestérol en hormones stéroïdiennes dans les cellules de Leydig (Tiré de [57]).

Une fois la testostérone synthétisée, cette dernière peut se déplacer librement ou se lier à une protéine de transport telle que l'albumine sérique ou la globuline liant les hormones sexuelles (SHBG) afin de se déplacer dans l'organisme [58]. Une fois dans la prostate, la testostérone peut entrer dans les cellules par transport passif. Elle peut ensuite se lier au récepteur des androgènes (RA) en déplaçant une protéine de choc thermique. Le RA est un récepteur nucléaire, il s'agit d'une protéine de 110 kDa possédant 5 zones principales: le domaine de régulation transcriptionnel N-terminal, le domaine de liaison à l'ADN (DBD), une région charnière, le domaine de liaison du ligand (LBD) et le domaine de régulation transcriptionnel C-terminal [59] (Figure 1.6).

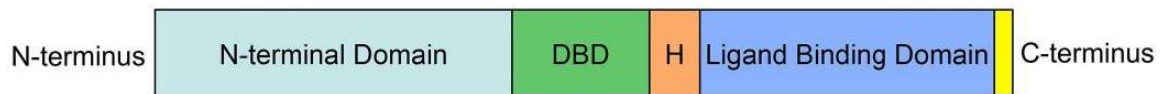


Figure 1.6 Représentation des domaines principaux du récepteur des androgènes (Tiré de [59]).

Le complexe androgène-récepteur va ensuite subir une phosphorylation et se lier avec un autre complexe androgène-récepteur afin de générer un homodimère. C'est cette espèce qui, en passant par les pores nucléaires, va transloquer dans le noyau cellulaire pour se lier sur l'élément de réponse des androgènes de l'ADN. Ceci va stimuler le recrutement des coactivateurs et entraînera les effets biologiques propres aux androgènes, tel que la stimulation de la synthèse du PSA, la survie cellulaire et bien entendu, la croissance des cellules [60] (Figure 1.7).

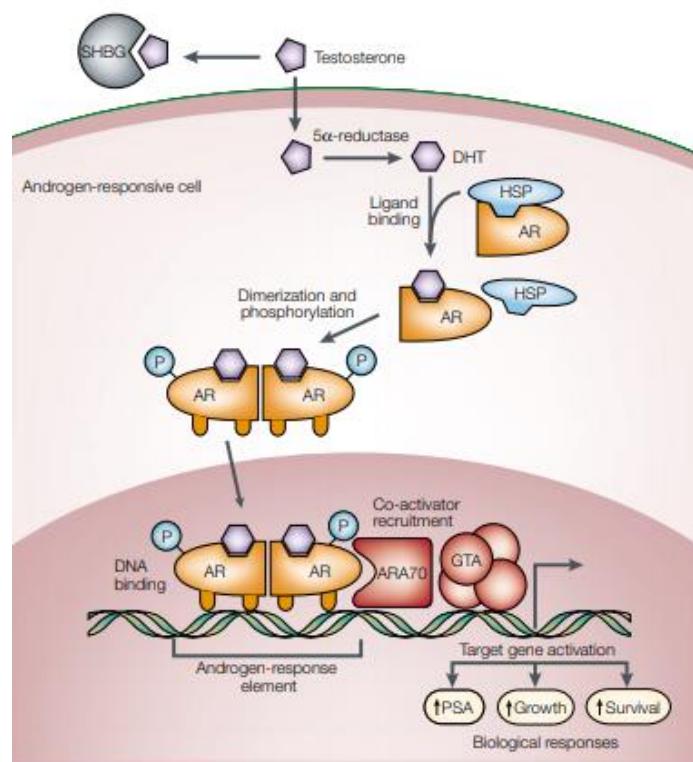


Figure 1.7 Mécanisme d'action des androgènes (Tiré de [60]).

Le cancer de la prostate est donc très souvent hormonodépendant, c'est-à-dire que la croissance cellulaire induite par les hormones androgéniques a un impact considérable sur le développement de ce cancer. Or, bien que la plupart des cancers sont initialement hormonodépendants, la quasi-totalité finissent par muter pour devenir hormonoindépendants, devenant ainsi des cancers de la prostate résistant à la castration (CPRC). Dans ces cancers, les cellules cancéreuses continuent de se différencier indépendamment de l'action ou du taux d'androgènes dans le sang. Cette forme avancée de la maladie est souvent liée à l'apparition de métastases et les pronostics sont souvent plus sombres pour les patients [60]. Plusieurs phénomènes expliquent pourquoi les cancers de la prostate mutent en CPRC, à commencer par des mutations ponctuelles du RA. La plupart de ces mutations se produisent dans le LBD, ce qui modifie la façon dont le RA interagit avec les androgènes et toutes les molécules éventuellement aptes à se lier au RA [61]. Une panoplie de nouvelles molécules sont ainsi susceptibles de devenir des agonistes de ce récepteur, pouvant désormais stimuler la croissance cellulaire. Aussi, une amplification du RA dans les cellules cancéreuses et une apparition de certains variants de cette protéine contribuent grandement au développement d'un CPRC [61]. D'autres études ont démontré que la signalisation induite par le récepteur des glucocorticoïdes, l'augmentation des populations de cellules souches, la différenciation des cellules neuroendocrines et certaines voies de signalisation oncogènes seraient toutes liées à la transformation d'un cancer hormonodépendant en CPRC [61].

#### 1.4 Thérapies et traitements contre le cancer de la prostate

Plusieurs types de traitement existent aujourd'hui afin de contrer le cancer de la prostate. L'un de ces traitements est la chirurgie. Bien que très invasive, la chirurgie peut se montrer très efficace dans le traitement de la maladie. La chirurgie la plus courante est la prostatectomie radicale, soit l'ablation entière de la prostate et des vésicules séminales. Cette chirurgie peut aujourd'hui être réalisée avec une assistance

robotique. Cette technique permet de contenir le cancer et de l'éliminer avant qu'il ne se propage dans l'organisme. Par contre, plusieurs inconvénients découlent de ce type d'intervention, notamment des problèmes d'incontinence urinaire et des troubles d'ordre sexuels. Toutefois, le haut taux de succès de cette chirurgie fait en sorte que cette méthode est l'une des plus communément choisies pour le traitement d'un cancer de la prostate localisé [62]. L'autre forme de chirurgie la plus utilisée est l'orchidectomie bilatérale, c'est-à-dire l'amputation chirurgicale des testicules. Cette opération a pour but de diminuer drastiquement l'apport en androgène aux cellules cancéreuses, ce qui diminue la vitesse de croissance d'un adénocarcinome de la prostate hormonodépendant. En plus de se montrer efficaces, les patients ayant subi cette chirurgie peuvent généralement retrouver une bonne santé psychologique et sexuelle s'ils entreprennent une thérapie de remplacement des androgènes, une fois qu'ils sont en rémission [63].

Une autre stratégie médicale dans le traitement d'un cancer de la prostate est la radiothérapie, une forme de traitement consistant à utiliser des ondes plus ou moins énergétiques afin de détruire les cellules cancéreuses [64]. Il existe deux types principaux de radiothérapie: la radiothérapie externe et la curiethérapie. En radiothérapie externe, des faisceaux de rayons X sont focalisés directement sur la tumeur du patient, ce qui permet de détruire les cellules cancéreuses. En curiethérapie, des sources radioactives telles que de l'iode 125 ou de l'iridium 192 sont placées à l'intérieur de la prostate du patient. Ces sources émettent des rayonnements qui détruisent les cellules cancéreuses. La radiothérapie est souvent combinée à d'autres formes de traitement et elle augmente substantiellement les chances de survie des patients [64].

L'un des traitements les plus utilisés dans la lutte contre le cancer de la prostate est la chimiothérapie. Cette thérapie utilise des drogues afin d'entraîner la mort des cellules cancéreuses. Plusieurs types d'agents chimiothérapeutiques sont utilisés dans le

traitement de ce cancer, à commencer par les agents alkylants. Ces composés introduisent généralement des groupes alkyles sur les guanines de l'ADN, ce qui empêche l'assemblage correct des doubles brins de l'ADN, causant des bris qui perturbent la division des cellules et entraînent éventuellement la mort cellulaire [65]. Certaines de ces molécules peuvent également lier des brins d'ADN ensemble par l'intermédiaire des guanines, ce qui perturbe la conformation de l'ADN et mène à l'apoptose. Les agents alkylants les plus utilisés dans le traitement du cancer de la prostate sont le cisplatine, le carboplatine, le satraplatine, la cyclophosphamide et l'estrामustine, un dérivé de moutarde azotée [65]. Les antimétabolites sont une autre classe d'agents chimiothérapeutiques couramment employés. Ces médicaments inhibent une voie métabolique qui entraîne directement ou indirectement la mort cellulaire. Dans le cas du cancer de la prostate, le 5-fluorouracil et le capécitabine sont particulièrement utilisés. Ces médicaments sont des inhibiteurs de la thymidylate synthase, une enzyme impliquée dans la synthèse de la thymidine. Son inhibition affecte ainsi la réplication de l'ADN. Un autre antimétabolite utilisé est le méthotrexate, un inhibiteur compétitif de la dihydrofolate réductase [66].

Parmi les autres types d'agents anticancéreux on retrouve les agents intercalants, qui sont des molécules capables de s'insérer de façon quasi irréversible entre deux paires de bases de l'ADN [65]. Ces molécules induisent des distorsions menant à l'apoptose. La doxorubicine est un agent intercalant particulièrement utilisé dans le traitement de l'adénocarcinome de la prostate [67]. De plus, les inhibiteurs de la topoisomérase constituent également une classe de composé régulièrement employés en clinique. Ces molécules inhibent l'action de la topoisomérase I ou de la topoisomérase II, des enzymes qui régissent la topologie de l'ADN. La mitoxantrone est un inhibiteur de la topoisomérase II qui améliore grandement les chances de survies des patients. La mitoxantrone est souvent administrée avec de la prednisone, un corticostéroïde possédant une action anti-inflammatoire. Il est à noter que les inhibiteurs des topoisomérases possèdent souvent des propriétés intercalantes [68]. Enfin, un autre

type d'agent anticancéreux très prisé en chimiothérapie est les inhibiteurs des microtubules [65]. Les microtubules sont des polymères de tubulines formant le cytosquelette. En inhibant les fonctions normales des microtubules, certaines molécules peuvent prévenir la mitose des cellules, et donc l'évolution d'un cancer. Le docétaxel et le paclitaxel sont des diterpènes de la famille des taxanes et ils constituent les inhibiteurs des microtubules les plus utilisés dans le combat contre le cancer de la prostate [69].

La thérapie ciblée est aussi une forme de traitement très efficace du cancer de la prostate [70]. Cette forme de thérapie s'intéresse aux mécanismes moléculaires propres au cancer de chaque patient. Une fois qu'un mécanisme moléculaire influençant le développement du cancer est identifié, il est sélectivement inhibé à l'aide d'un médicament. Les mécanismes problématiques peuvent être d'origine génétique, protéique ou ils peuvent également provenir de l'environnement tissulaire de la tumeur. Par exemple, si une équipe médicale identifie que des mutations ponctuelles dans les gènes BRCA1 et BRCA2 sont en grande partie responsable du cancer d'un patient, il est possible d'administrer au patient de l'olaparib. Il s'agit d'un inhibiteur des poly(ADN-ribose) polymérase (PARP). Il a été démontré que les cancers impliquant des mutations aux gènes BRCA1 et BRCA2 sont très sensibles aux inhibiteurs des PARP, ces derniers étant souvent indispensables à un bon fonctionnement de la division cellulaire et à la réparation de l'ADN [70]. La rucaparib peut également être utilisée à cet effet [71].

L'immunothérapie, aussi appelée thérapie biologique, est une forme de traitement consistant à stimuler les défenses immunitaires du corps afin de combattre la maladie [72]. Dans le cadre d'un cancer de la prostate métastatique, le vaccin sipuleucel-T peut être une option de traitement. Ce vaccin est personnalisable pour chaque patient. Des cellules dendritiques du patient, qui sont des cellules du système immunitaire, sont obtenues à partir de cellules souches récoltées lors d'une prise de sang. Ces cellules

sont modifiées *in vitro* afin de présenter des caractéristiques du cancer du patient avant d'être réinjectées dans son corps. Cette opération a pour but de stimuler le système immunitaire à reconnaître les antigènes tumoraux [72].

Enfin, l'une des avenues thérapeutiques les plus importantes dans le traitement du cancer de la prostate est l'hormonothérapie, un type de thérapie cherchant à minimiser l'impact des androgènes sur le cancer [73]. Étant donné que les androgènes sont les hormones stimulant le plus intensément le développement d'un cancer de la prostate, l'hormonothérapie est très utilisée en clinique. Outre l'orchidectomie bilatérale, dont les effets sont permanents, il existe d'autres façons de minimiser l'effet des androgènes sur un adénocarcinome de la prostate. L'une de ces façons est d'utiliser des médicaments tels que l'acétate d'abiratéron et le kétoconazole. Ces molécules perturbent la stéroïdogénèse en inhibant l'activité du CYP17A1, empêchant ainsi la production de testostérone. Sinon, il a été prouvé que des agonistes de l'hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires (GnRH) possèdent des propriétés thérapeutiques dans le traitement du cancer de la prostate hormono-dépendant [74]. Ces agonistes bloquent les signaux nécessaires à la production de la testostérone dans le corps de l'homme, bien que cette dernière est généralement stimulée au début de la prise des agonistes. Les principaux agonistes de la GnRH sont la leupropéline, la goséréline et la triptoréline [73]. Il est aussi possible d'utiliser des antagonistes de la GnRH afin d'amoindrir le taux de testostérone dans le corps. L'avantage des antagonistes est qu'ils ne causent pas de hausse du taux de testostérone dans les débuts du traitement, en plus d'être généralement plus efficaces. Le dégarélix et le rélugolix sont souvent utilisés à cet effet [75].

Au lieu de s'attaquer à la synthèse des androgènes, il est possible d'amoindrir l'effet des androgènes sur le cancer en perturbant l'action du RA. Certaines molécules peuvent se lier fortement au RA sans déclencher de réponses biologiques. Leur liaison au RA empêche les androgènes de s'y lier, prévenant ainsi ces derniers de stimuler la

croissance des cellules cancéreuses. Pour cette raison, ces médicaments sont souvent désignés comme étant des bloqueurs hormonaux ou des antiandrogènes. Les plus populaires sont l'acétate de cyprotérone, le bicalutamide, le flutamide, l'apalutamide, le nilutamide, le darolutamide et l'enzalutamide [75] (Figure 1.8).

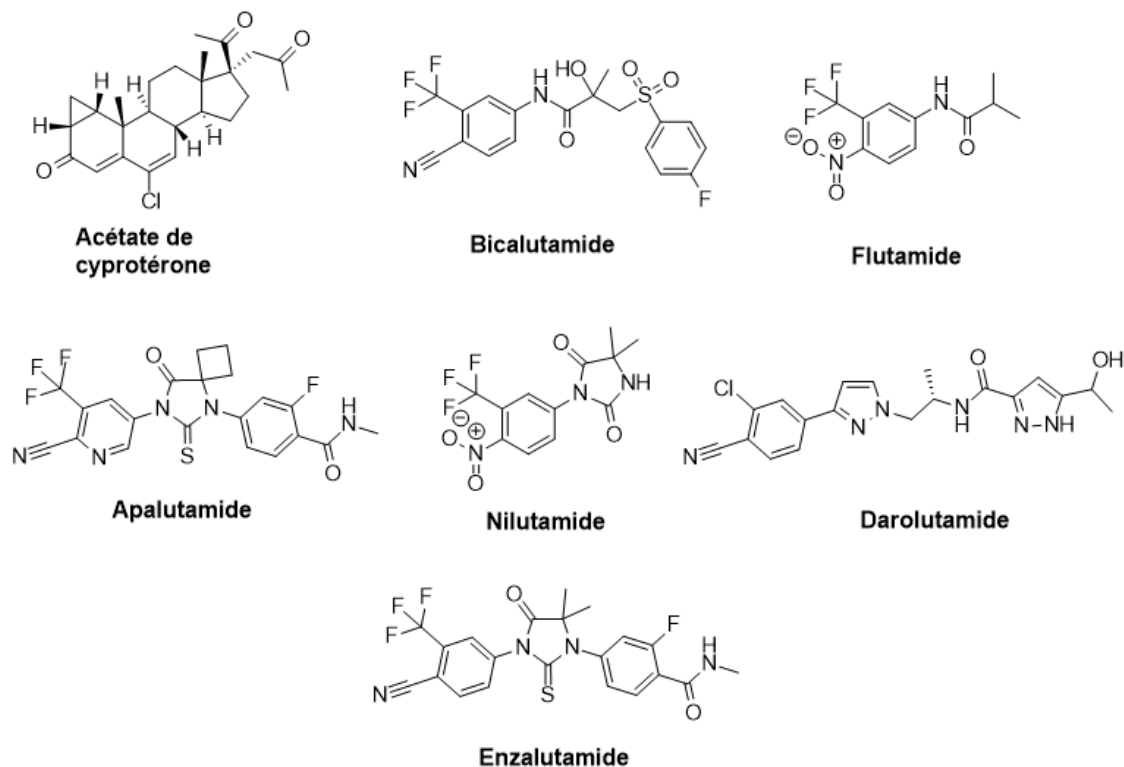


Figure 1.8 Représentation des principaux antiandrogènes utilisés en clinique [75].

Des agents permettant une dégradation du RA sont présentement en cours de développement [76]. Il est à noter que bien que les bloqueurs hormonaux soient une forme efficace de thérapie, ces médicaments ne sont plus d'aucune utilité lorsque le cancer de la prostate mute pour devenir résistant à la castration. C'est précisément ce problème qui pousse la communauté scientifique à développer des bloqueurs hormonaux plus agressifs, permettant ainsi d'endiguer rapidement le cancer avant que celui-ci ne devienne trop compliqué à traiter.



## CHAPITRE II

### PROPRIÉTÉS ANTIANDROGÉNIQUES DES DIMÈRES STÉROÏDIENS

#### 2.1 Généralités sur les dimères

Le terme dimère vient du terme grec *dimeres* signifiant « en deux parties ». Par définition, un dimère est une molécule composée de deux unités semblables reliées ensemble de manière covalente [77] (Figure 2.1).

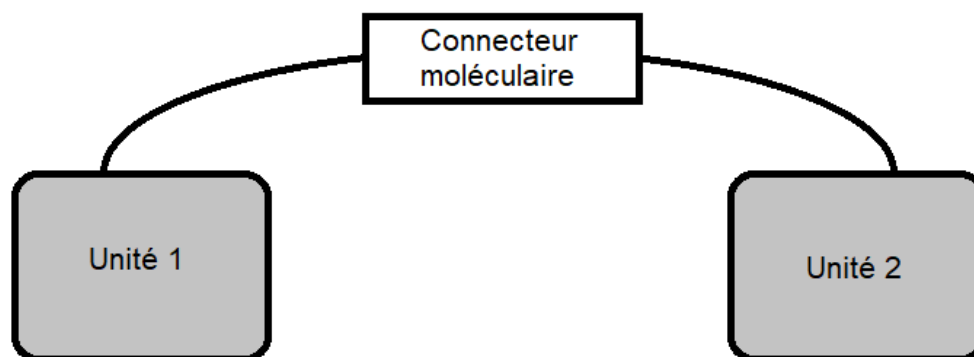


Figure 2.1 Représentation des principales composantes d'une molécule dimérique.

Les deux unités sont reliées ensemble par un connecteur moléculaire, également appelé « *linker* ». Le connecteur moléculaire est une suite d'atomes liés ensemble de

manière covalente. Ce connecteur est généralement assez solide et résiste à la dégradation, bien qu'il puisse être flexible.

Les dimères sont assez présents dans la nature puisqu'il est aisé pour la nature de complexifier des molécules existantes en les dimérisant. Ce faisant, de nouvelles molécules distinctes, possédant maintenant un plan de symétrie, sont créées et ces dernières peuvent exécuter des actions plus spécifiques que leurs précurseurs. La propension pour la nature à dimériser des molécules est même visible au niveau macroscopique. En effet, bon nombre de structures biologiques exhibent une symétrie provenant directement de la stratégie de dimérisation employée par la nature au niveau microscopique. Il ne s'agit que d'observer la structure du corps humain, de certains végétaux, fruits et animaux pour s'apercevoir que la symétrie est bien présente tout autour de nous.

## 2.2 Éléments de symétrie

Bien que la symétrie soit extrêmement présente au niveau moléculaire, il est important de noter que plusieurs types de symétries existent, puisque les molécules sont susceptibles de posséder plusieurs plans de symétrie différents. Ces types de symétries sont tous décrits selon la théorie des groupes. Cette théorie appartient à une branche de l'algèbre abstraite s'intéressant à l'étude et à la manipulation des concepts impliquant la symétrie [78]. Le but de la théorie des groupes est de catégoriser les molécules en plusieurs groupes, dépendamment des éléments de symétries que présentent les molécules. Ceci est effectué afin de faire des rapprochements entre les différentes molécules possédant des éléments de symétries similaires, car ces molécules sont susceptibles de posséder des propriétés semblables.

Afin de classer les molécules dans les différents groupes, il faut d'abord définir les types d'opérations géométriques que peut subir une molécule avant de retrouver une

position identique à sa conformation initiale. Par exemple, si une molécule n'est pas symétrique, la seule opération géométrique que cette dernière peut effectuer est l'identité ( $E$ ), c'est-à-dire qu'elle ne peut effectuer qu'une rotation de  $360^\circ$  sur elle-même avant de reprendre sa position initiale. Une autre opération géométrique possible est l'opération  $C_n$ , désignant l'opération permettant à une molécule de procéder à une rotation de  $(360/n)^\circ$  autour d'un axe avant de retrouver une position identique à sa position initiale. L'opération de réflexion  $\sigma$  indique si une molécule possède un plan de réflexion vertical ( $\sigma_v$ ), horizontal ( $\sigma_h$ ) ou selon un plan dièdre ( $\sigma_d$ ), alors que l'opération d'inversion  $i$  s'applique si chaque point d'une molécule peut être représenté dans un plan en trois dimensions et inversé par rapport au centre de la molécule afin de retrouver la molécule de départ. Enfin, l'opération de rotation impropre  $S_n$  s'applique à une molécule s'il est possible d'appliquer l'opération  $C_n$  suivis d'une réflexion selon un plan perpendiculaire à l'axe de rotation.

Il existe deux types de classifications pour les molécules symétriques. Le premier est le système de Schoenflies, qui permet de classer les molécules dans leurs groupes respectifs selon un diagramme de flux (Figure 2.2).

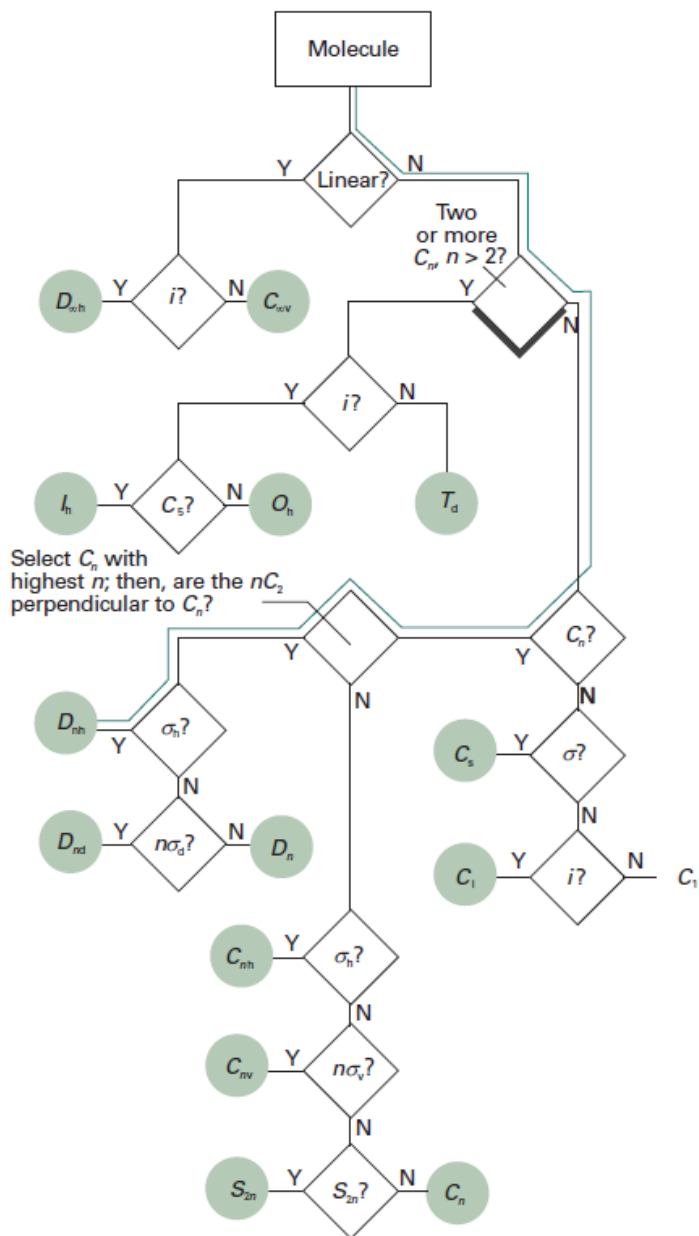


Figure 2.2 Diagramme de flux indiquant les groupes des molécules symétriques selon le système de Schoenflies (Tiré de [79]).

L'autre système permettant de classer les molécules en différents groupes est le système d'Hermann-Mauguin, aussi connu sous le nom de Système international (Tableau 2.1).

### Groupes de symétrie selon le Système international

$C_i$	$\bar{i}$								
$C_s$	$m$								
$C_1$	$I$	$C_2$	$2$	$C_3$	$3$	$C_4$	$4$	$C_6$	$6$
		$C_{2v}$	$2mm$	$C_{3v}$	$3m$	$C_{4v}$	$4mm$	$C_{6v}$	$6mm$
		$C_{2h}$	$2m$	$C_{3h}$	$\bar{6}$	$C_{4h}$	$4/m$	$C_{6h}$	$6/m$
		$D_2$	$222$	$D_3$	$32$	$D_4$	$422$	$D_6$	$622$
		$D_{2h}$	$mmm$	$D_{3h}$	$\bar{6}2m$	$D_{4h}$	$4/mmm$	$D_{6h}$	$6/mmm$
		$D_{2d}$	$\bar{4}2m$	$D_{3d}$	$\bar{3}m$	$S_4$	$4/m$	$S_6$	$3$
$T$	$23$	$T_d$	$\bar{4}3m$	$T_h$	$m\bar{3}$				
$O$	$432$	$O_h$	$m\bar{3}m$						

Tableau 2.1 Nomenclature des principaux groupes de symétrie selon la classification d'Hermann-Mauguin (Adapté de [79]).

Dans le système international, la dénomination des groupes de symétries est légèrement différente du système de Schoenflies. Ici, le nom du groupe désigne exactement la suite d'opérations la plus complexe qu'une molécule peut effectuer avant de revenir à sa position originale. La terminologie des opérations est aussi différente : un nombre  $n$  dénote la présence de  $n$  axes de symétries alors que la lettre  $m$  représente un miroir plan. Une barre oblique / désigne que le miroir plan est perpendiculaire à l'axe de symétrie et une barre au-dessus d'un nombre indique que cet élément est combiné à une opération d'inversion. Mais peu importe quel système est employé, les conclusions

qu'il est possible de tirer par rapport aux propriétés des molécules finissent par se recouper.

### 2.2.1 Symétrie moléculaire dans la nature

Étant donné que la nature dimérise des molécules naturelles afin de gagner en complexité, il est normal qu'une certaine proportion des produits naturels possède certains éléments de symétrie. En fait, il est estimé que 7% des produits naturels possèdent une symétrie bilatérale [80]. Ce type de symétrie est définie comme étant la propriété d'une entité à pouvoir être divisée en deux parties identiques se retrouvant chacune de chaque côté d'un plan unique. Selon la théorie des groupes, les molécules possédant une symétrie bilatérale se retrouvent dans les groupes  $C_2$ ,  $C_s$  et  $C_{2v}$  (Figure 2.3).

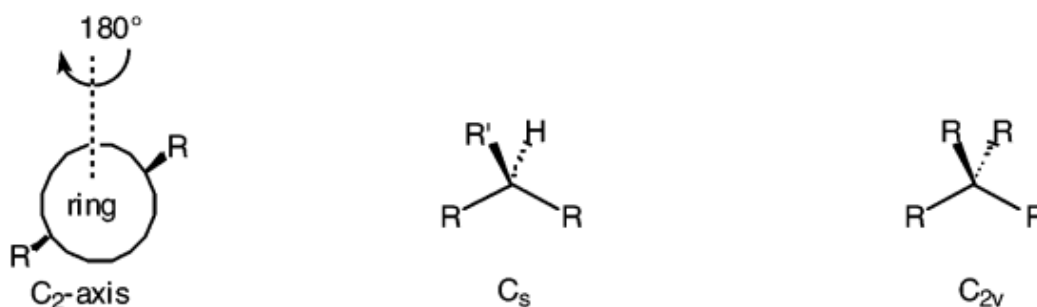


Figure 2.3 Représentation des principaux types de symétrie présents dans la nature (Tiré de [80]).

Les molécules possédant une symétrie bilatérale sont réparties dans la nature parmi les plantes (65%), les animaux (22%), les bactéries (8%) et les champignons (4%) [80]. Parmi les 3 types de symétrie composant la symétrie bilatérale, la symétrie de type  $C_2$  est la plus retrouvée dans la nature, notamment à cause de la facilité pour la nature de produire des molécules possédant ce genre de symétrie (Figure 2.4).

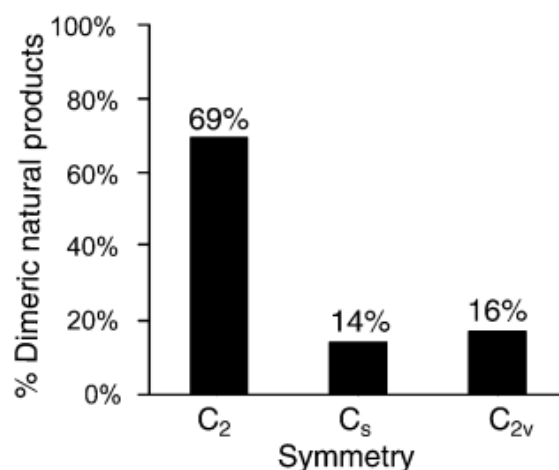


Figure 2.4 Répartition des principaux types de symétrie retrouvés dans la nature (Tiré de [80]).

La symétrie bilatérale est présente dans à peu près toutes les classes de molécules, mais certains types de molécules présentent une plus grande proportion de molécules symétriques. Par exemple, les protéines sont l'une des classes de molécules où la symétrie bilatérale est la plus présente. Il est estimé qu'entre 10% et 15% de tous les domaines protéiques sont symétriques [81]. Plusieurs facteurs viennent expliquer cela. Tout d'abord, les protéines ont avantage à avoir une taille plus importante, et un moyen facile d'augmenter la taille d'une molécule est de la dimériser ou de l'oligomériser. En possédant une taille plus importante, les protéines peuvent acquérir des fonctions plus complexes, elles peuvent moduler leur action biologique en induisant de nouveaux sites allostériques dans leurs structures, elles acquièrent une stabilité plus accrue vis-à-vis la dégradation et elles parviennent à réduire leur surface de contact, ce qui minimise l'impact que les solvants peuvent avoir sur la conformation de ces dernières, tout en diminuant la quantité de solvant requise afin de les hydrater [82].

Par ailleurs, les protéines tirent avantage à être composées de sous-unités, notamment car le contrôle des erreurs de traduction génétiques est amélioré: les sous-unités défectueuses pouvant simplement être rejetées. Aussi, l'efficacité codante est

améliorée, car il est possible de créer de larges structures en utilisant le minimum d'espace génétique, étant donné que chaque sous-unité provient de la même section de l'ADN. La régulation de l'assemblage est également facilitée puisque les dimères et les oligomères sont sujets à des transitions de phase plus sensibles [82].

Enfin, plusieurs raisons viennent expliquer pourquoi les protéines dimériques et oligomériques sont souvent symétriques. Il est d'abord établi que généralement, les assemblages symétriques sont plus bas en énergie [83]. Étant donné que la nature choisit souvent le chemin le moins énergétique afin d'arriver à ses fins, il est normal que s'il est avantageux pour des organismes de posséder de grosses protéines, ces dernières adoptent une conformation énergétiquement stable. Ensuite, les protéines dimériques ou oligomériques symétriques offrent l'avantage de posséder un assemblage fini. Bien qu'il soit théoriquement possible pour la nature de fabriquer de protéines volumineuses possédant une symétrie hélicoïdale ou appartenant à d'autres groupes de symétrie, les oligomères possédant quelques sous-unités offrent l'avantage de posséder des mécanismes de croissance et de maturation beaucoup plus simples [80]. Enfin, les protéines symétriques possèdent souvent une cinétique de repliement plus avantageuse que les protéines asymétriques. Les protéines symétriques requièrent donc souvent moins d'énergie afin d'adopter leurs conformations finales [84].

### 2.3 Antiandrogènes dimériques

Les antiandrogènes dimériques sont des composés inhibiteurs des androgènes formés de deux sous-unités. L'action antiandrogénique de ces dimères provient de leur capacité à perturber la conformation symétrique du complexe RA-DHT (Figure 2.5)



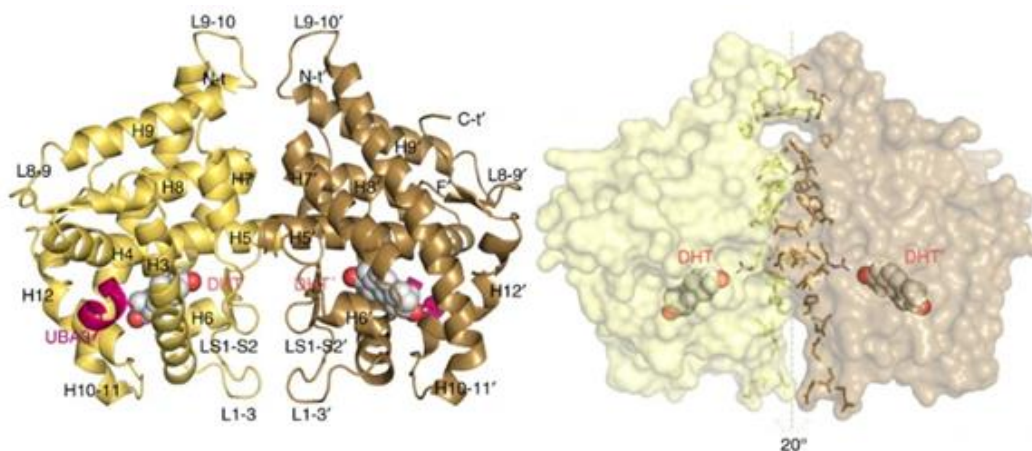


Figure 2.5 Cliché cristallographique et représentation du complexe dimérique RA-DHT (Tiré de [85]).

Comme décrit à la section 1.3.3, la DHT se lie d'abord au RA dans la voie de signalisation des androgènes et ce complexe dimérise sur lui-même afin de générer un homodimère de symétrie  $C_2$ . La bonne conformation de cet homodimère est capitale pour l'obtention de l'activité biologique des androgènes. C'est le bon repliement de ce complexe qui permet la phosphorylation et la translocation du RA dans le noyau cellulaire. La stratégie de la thérapie par les dimères est de perturber la conformation du complexe symétrique des RA en traitant un patient avec un dimère composé de deux ligands du RA reliés ensemble par une chaîne moléculaire. L'idée est que le dimère remplace les deux molécules de DHT dans le complexe final. Dans ce cas, la chaîne moléculaire reliant les deux ligands perturberait le repliement spontané de ce complexe, empêchant ainsi sa translocation dans le noyau cellulaire et inhibant les effets biologiques habituellement déclenchés par les hormones androgéniques. L'avantage est que les ligands du dimère peuvent également être à base d'androgènes, qui sont les ligands naturels conçus pour se lier fortement au RA. Toutefois, étant donné que le corps continue à produire des androgènes, il s'agit ici d'une inhibition compétitrice entre les dimères et les androgènes libres (Figure 2.6).

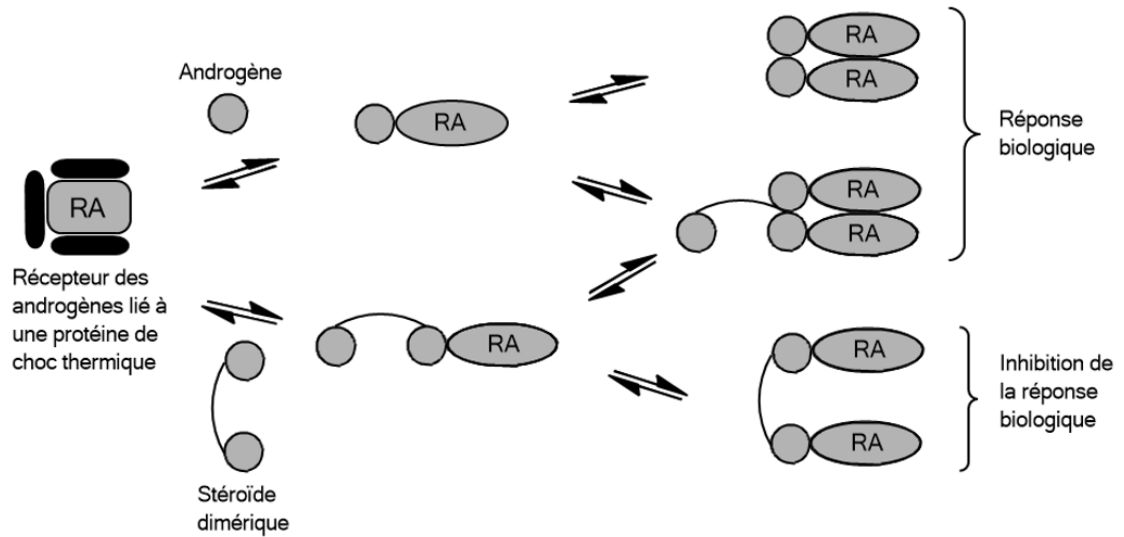


Figure 2.6 Modèle d'interaction des androgènes dimériques et des androgènes libres avec le RA (Adapté de [86]).

C'est donc le connecteur moléculaire reliant les deux ligands qui entraîne des modifications structurales empêchant la translocation du complexe dans le noyau cellulaire. Bien que les dimères doivent compétitionner avec les androgènes libres, il est prouvé qu'un complexe lié à un dimère est thermodynamiquement plus stable qu'un complexe lié à deux ligands libres [87]. Ce phénomène est dû aux interactions polyvalentes entre un ligand et son récepteur. Ces interactions se produisent entre de multiples sites entre un ligand et son récepteur. Plus il y a d'interactions polyvalentes lors de l'ancrage d'un ligand à un récepteur, plus le ligand est susceptible de se lier fortement et donc d'avoir une constante de dissociation plus faible. Dans le cas d'un ligand qui serait dimérisé, les interactions polyvalentes du ligand de base sont doublées. Ainsi, le dimère se lie plus fortement aux deux sites actifs du récepteur que deux monomères libres [88]. L'équilibre de liaison au RA entre les androgènes et les dimères d'androgène est donc déplacé vers les dimères.

### 2.3.1 Avantages et inconvénients de la thérapie à base de ligands dimériques

La thérapie des dimères antiandrogéniques possède plusieurs avantages et inconvénients pour le traitement d'un adénocarcinome de la prostate. Le premier avantage est bien entendu le fait qu'il puisse s'agir d'une thérapie à base de produits naturels; les androgènes. Ces produits ont grandement été étudiés et leurs impacts sur le corps sont connus. Il y a donc moins de risque d'activer certaines voies métaboliques par la liaison du dimère à des protéines insoupçonnées, un problème qui peut malheureusement subvenir avec des drogues complètement synthétiques. La spécificité de l'action biologique est également un grand avantage des drogues faites à bases de produits naturels endogènes. Aussi, les paramètres pharmacocinétiques tels que la biodisponibilité, le volume de distribution, la clairance et le temps de demi-vie sont beaucoup plus faciles à optimiser pour une molécule à base de produit naturel animal, puisque la nature a déjà conçu le dit produit afin d'être compatible avec l'organisme. Le produit devrait donc déjà posséder une certaine stabilité dans les conditions biologiques, un problème qui complique bien souvent le développement des drogues complètement synthétiques.

Un autre avantage est l'efficacité de cette approche. Les composés dimériques sont étudiés depuis très longtemps et sont aujourd'hui utilisés dans l'élaboration de nombreuses drogues expérimentales [89]. Également, il est assez facile de développer un dimère de produit naturel, car la rationalisation des effets biologiques est aisée. En effet, si l'on connaît la façon dont le produit naturel de base interagit avec son récepteur, il est plutôt facile de concevoir un médicament efficace à base de ce produit. Enfin, une synthèse chimique partant d'un produit naturel comme point de départ peut être plus rapide et efficace que la synthèse d'une molécule complètement synthétique. Si le produit final est un dimère symétrique, la voie de synthèse peut être très efficace, car une réaction de couplage comme la métathèse d'oléfines peut terminer cette dernière.

La thérapie par les dimères antiandrogéniques possède toutefois certains inconvénients. D'abord, les dimères sont toujours en compétition avec les androgènes libres dans l'organisme. Même si l'équilibre thermodynamique favorise la liaison du RA aux dimères, cela fait en sorte qu'il ne peut jamais y avoir une inhibition totale de la croissance des cellules cancéreuses induite par les androgènes. Aussi, étant donné que les cancers de la prostate hormonodépendants finissent par muter en CPRC, toute forme d'hormonothérapie ne peut constituer une solution à long terme. Également, l'utilisation d'antiandrogènes peut présenter des effets secondaires indésirables pour le patient, tels que l'ostéoporose, l'anémie et des troubles d'ordre sexuels [90]. Enfin, un dimère d'androgènes ne se comporte pas exactement de la même manière qu'un androgène libre, l'interaction avec certaines protéines peut être altérée. Par exemple, les unités de testostérone sur un dimère peuvent avoir plus de mal à être réduites en DHT par l'enzyme 5 $\alpha$ -réductase comparativement à la testostérone libre. Les interactions des dimères avec certaines protéines restent donc à étudier.

## CHAPITRE III

### DESCRIPTION ET FONDEMENTS DU PROJET DE RECHERCHE

Le présent projet de recherche porte sur le développement de dimères d'androgènes dans une perspective hormonothérapeutique vis-à-vis le cancer de la prostate. Le travail effectué au cours du projet comprend l'élaboration et le design des molécules cibles, la synthèse de ces dernières, leur purification et leur évaluation biologique par le biais de plusieurs tests *in vitro*. Au cours du projet, il a été possible de fabriquer deux séries de dimères d'androgènes, possédant toutes deux des structures de base distinctes.

Accessoirement, les dimères d'androgènes ont pu être utilisés par une équipe de chercheur à l'Université de la Californie à Irvine afin d'aider à obtenir un cliché de diffraction par rayons X du site actif du cytochrome P450 3A4, une enzyme monooxygénase très impliquée dans le métabolisme des substances xénobiotiques [91]. Puisqu'il est difficile de cristalliser une protéine afin d'obtenir un solide cristallin pouvant diffracter les rayons X, en raison de la taille et de la flexibilité des peptides, une stratégie est de fixer une région de la protéine à l'aide d'un ligand, ce qui stabilise cette dernière et peut mener à la formation d'un co-cristal. Puisque le centre catalytique du cytochrome P450 3A4 est sensible aux androgènes, un moyen d'obtenir un co-cristal du site actif est de le lier à des antiandrogènes, qui sont dans ce cas-ci les dimères élaborés au cours de ce projet. Les résultats pour chacune des séries de dimères seront abordés dans les chapitres IV et V.

### 3.1 Travaux antérieurs

Des dimères de la testostérone possédant des vertus antiandrogéniques ont déjà été synthétisés au laboratoire dans le passé. Les premiers dimères furent synthétisés en 2010 par M. Dominic Bastien. Les unités testostérone de ces dimères sont reliées par un connecteur moléculaire alcénique de 4 carbones en position  $7\alpha$  sur le noyau des stéroïdes (Figure 3.1). Ici, 7 réfère au numéro du carbone et  $\alpha$  signifie la stéréochimie du lien formé (un lien  $\alpha$  entre dans le plan alors qu'un lien  $\beta$  en sort).

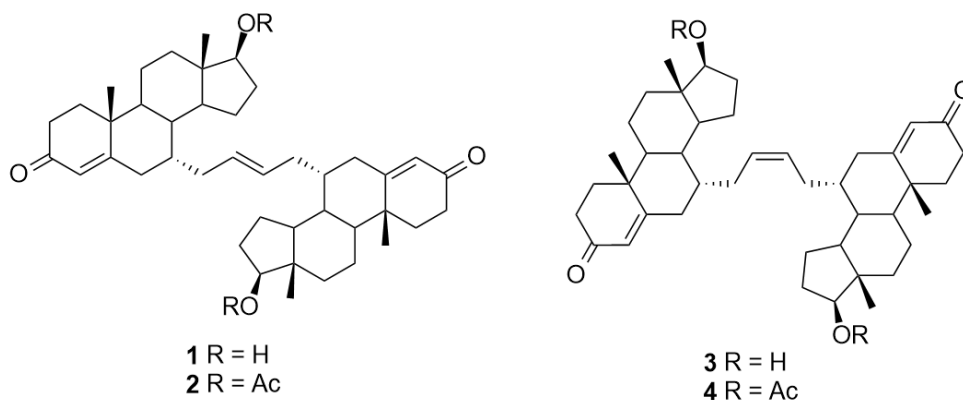


Figure 3.1 Première génération de dimères de la testostérone possédant un connecteur moléculaire carboné en position  $7\alpha$

Les dimères **2** et **4** ont pu être synthétisés en 4 étapes à partir de la testostérone. Un traitement acide permet de déprotéger les groupements acétyles afin de générer les dimères **1** et **3**. Des analyses cristallographiques ont permis de différencier la stéréochimie de l'alcène central de ces deux dimères (Figure 3.2).

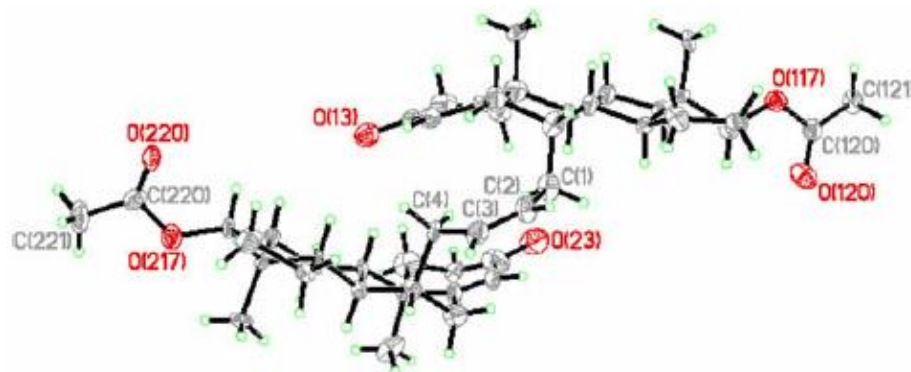


Figure 3.2 Cliché de diffraction des rayons X du dimère **4**.

Des 4 dimères synthétisés, les composés **1** et **3** devraient théoriquement être ceux qui possèdent les effets biologiques les plus intéressants, car la testostérone est un ligand plus naturel vis-à-vis le RA que l'acétyltestostérone. Des tests biologiques ont été réalisés sur les dimères **1** et **3** et il a été découvert que ce dernier possède une activité antiproliférative semblable à l'acétate de cyprotérone (CPA), un médicament antiandrogénique vendu en pharmacie (Tableau 3.1).

Activité antiproliférative du CPA et des dimères **1** et **3** évalués par un test MTT.

Composé	LNCaP	PC3
	(AR+)	(AR-)
	IC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)
CPA	43,0 ± 2,5	32,3 ± 3,7
<b>1</b>	> 200	35,7 ± 3,7
<b>3</b>	30,3 ± 0,7	27,7 ± 1,5

Tableau 3.1 Évaluation de l'activité antiproliférative des dimères **1** et **3** sur les lignées cellulaires LNCaP et PC3 (Adapté de [92]).

L'activité antiproliférative des dimères **1** et **3** a été évaluée vis-à-vis les lignées cellulaires LNCaP et PC3 à l'aide d'un test MTT. Ces lignées cellulaires sont des types de cellules fréquemment utilisées dans l'évaluation *in vitro* des composés

potentiellement actifs contre le cancer de la prostate. Les cellules LNCaP possèdent le RA alors que les cellules PC3 ne le possèdent pas. En testant ces deux types de cellules, on peut discriminer l'importance du RA dans l'activité biologique des composés. L'activité antiproliférative est d'ailleurs exprimée sous forme d'IC<sub>50</sub>, c'est-à-dire la concentration minimale requise pour inhiber la croissance de la moitié d'une population cellulaire.

Dans le tableau 3.1, il est possible de constater que le dimère **3**, correspondant au dimère de testostérone en conformation *cis*, semble légèrement plus actif que le CPA. Le dimère **1**, quant à lui, semble inactif sur les cellules LNCaP, mais est relativement toxique pour les cellules PC3. Ceci démontre que la géométrie de l'alcène centrale est très importante pour l'interaction avec le RA. Ceci dit, le dimère **3**, bien qu'étant le composé le plus actif de cette étude, ne paraît pas posséder une toxicité sélective pour les cellules possédant le RA. Idéalement, il faudrait que les molécules soient actives par rapport aux cellules possédant le RA et inactives contre les cellules ne le possédant pas, ceci indiquerait que les composés sont sélectivement capables de perturber les fonctions biologiques des cellules possédant le RA, comme les cellules cancéreuses de la prostate. Néanmoins, ces résultats sont somme toute assez prometteurs.

Une deuxième série de dimères d'androgène fut élaborée dans le laboratoire par Mme Anne-Rose Vesper. Au cours de ses travaux, madame Vesper a pu synthétiser des dimères à base de testostérone possédant des connecteurs moléculaires de types diesters (Figure 3.3).



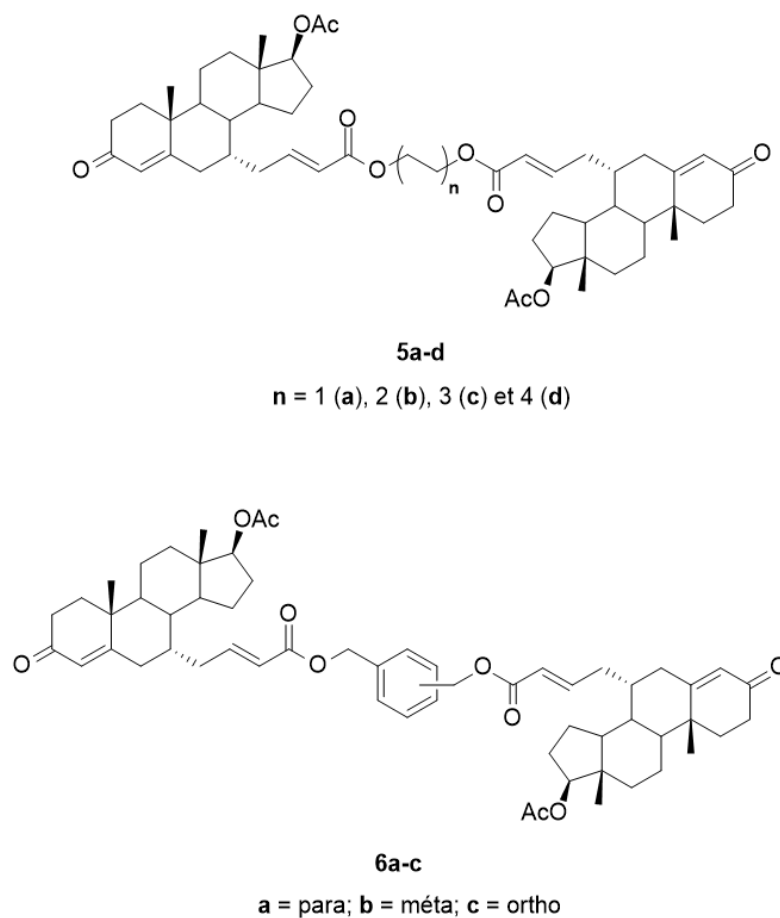


Figure 3.3 Séries de dimères de la testostérone possédant des connecteurs moléculaires de types diesters.

Les dimères **5a-d** possèdent tous des motifs structuraux semblables, mais varient selon la taille du connecteur moléculaire. Pour les molécules **6a-c**, c'est la régiochimie sur les noyaux aromatiques qui distingue chaque composé. Comme il sera possible de le constater, chacun de ces paramètres peut affecter drastiquement l'activité biologique (Tableau 3.2).

Activité antiproliférative du CPA et des dimères **5a-d** évaluée par un essai SRB.

Composé	LNCaP	DU-145	PC3
	(AR+)	(AR-)	(AR-)
	IC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)
CPA	44	98	85
<b>5a</b>	3,8	1,4	1,8
<b>5b</b>	17	>200	>200
<b>5c</b>	76	>196	>200
<b>5d</b>	29	>200	>200

Tableau 3.2 Évaluation de la cytotoxicité des dimères **5a** à **5d** sur les lignées cellulaires LNCaP, DU-145 et PC3 (Adapté de [93]).

Un essai à la sulforhodamine B (SRB), un essai colorimétrique permettant de mesurer la densité cellulaire d'une culture, a permis de tester les propriétés cytotoxiques des molécules **5a** à **5d**. Il est intéressant d'observer que la molécule **5a** est bien plus active que le CPA sur toutes les lignées cellulaires testées. Par contre, le composé **5b** présente une toxicité sélective pour la lignée cellulaire possédant le RA. Ainsi, la molécule **5b** serait potentiellement la molécule la plus prometteuse pour la suite des tests biologiques, car la taille du connecteur moléculaire semble être idéale pour perturber la conformation du complexe homodimérique des RA. On remarque d'ailleurs que lorsqu'on augmente la taille du connecteur moléculaire, les composés deviennent complètement inactifs par rapport aux cellules DU-145 et PC3. La toxicité est également amoindrie pour la lignée cellulaire LNCaP.

Or, bien que les résultats *in vitro* se montrent intéressants, les dimères d'androgènes possédant un connecteur moléculaire de type diester ne seraient pas de bons candidats pour l'élaboration d'une drogue. En effet, les esters sont beaucoup trop sensibles aux conditions physiologiques, non seulement à cause du pH de l'organisme, mais aussi à cause de la présence d'estérases qui hydrolysent rapidement les composés contenant des fonctionnalités esters. Ainsi, les dimères contenant des esters ne possèderaient

possiblement pas une action prolongée dans l'organisme. De ce problème naît la volonté de concevoir des dimères possédant une activité cytotoxique sélective visant les cellules exprimant le RA et possédant également une structure compatible avec les conditions physiologiques.

### 3.2 Objectifs du projet de recherche

Le projet de recherche consiste à synthétiser deux nouvelles séries de dimères d'androgènes, une série possédant un connecteur moléculaire en position  $7\alpha$  et l'autre en position  $17\alpha$  sur le noyau stéroïde. Chaque série de dimères sera conçue pour exhiber une toxicité sélective vis-à-vis les cellules possédant les éléments de réponse des androgènes et pour posséder une certaine stabilité dans l'organisme en vue de futurs essais *in vivo*. Par ailleurs, les dimères les plus intéressants seront évalués pour leurs affinités avec le site actif du cytochrome P450 3A4. Si un dimère peut se lier de manière assez forte au site actif, des essais de co-cristallisation seront réalisés afin d'obtenir un cliché de diffraction des rayons X du site catalytique de l'enzyme. Ces tests seront réalisés par une équipe de recherche basée à l'Université de la Californie à Irvine.

#### 3.2.1 Conception d'une série de dimères d'androgènes fonctionnalisée en position $7\alpha$

La première série de dimères conçue lors de ce projet est une série de dimères d'androgènes possédant un connecteur moléculaire en position  $7\alpha$ . Le rationnel biologique concernant cette série de dimères est la même que pour les autres dimères d'androgènes : construire des dimères qui iront se lier à deux RA afin de produire un complexe dimérique possédant une géométrie ne permettant pas la translocation dans le noyau cellulaire. Les dimères **1** et **3**, possédant un connecteur moléculaire alcénique en position  $7\alpha$ , ont démontré un certain potentiel biologique. Un des objectifs du projet de recherche est de produire une deuxième génération de dimères fonctionnalisés en position  $7\alpha$  afin d'obtenir de meilleurs résultats *in vitro*. Pour ce faire, il a fallu réviser

le design de la première génération afin d'arriver à une série de dimères possédant un motif structural plus intéressant au niveau médical (Figure 3.4).

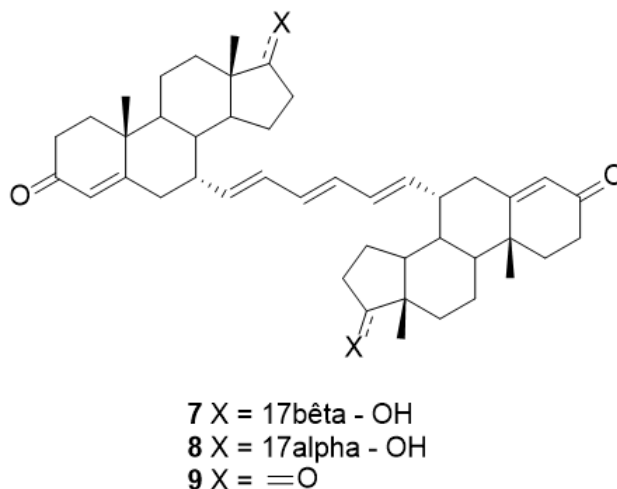


Figure 3.4 Représentation de la deuxième génération de dimères androgéniques fonctionnalisés en 7 $\alpha$ .

En analysant les structures du dimère de la testostérone **7**, du dimère d'épitestostérone **8** et du dimère d'androstènedione **9**, il est possible de prédire que ces derniers devraient posséder un pouvoir antiandrogénique plus grand ou comparable aux dimères **1** et **3**. La principale différence entre les deux séries de dimères est que le connecteur moléculaire allylique des dimères **1** et **3** a ici été remplacé par un connecteur de type triène. Ce connecteur semble très intéressant dans le contexte de dimères antiandrogéniques, et ce, pour plusieurs raisons. Tout d'abord, comme pour les dimères de la première génération, ce connecteur est composé exclusivement de liaisons carbones-carbones. Ces liaisons chimiques sont robustes et devraient résister au clivage dans l'organisme, ce qui permettrait au composé d'avoir une action prolongée. Par contre, une différence notable entre les deux séries de dimères est la longueur du connecteur moléculaire. En effet, le connecteur alcénique des dimères **1** et **3** possède 4 atomes de carbones alors que celui-ci en possède 6. Des analyses cristallographiques ont révélé que la distance entre les deux ligands DHT dans le complexe homodimérique

RA-DHT est de 14 Å [85]. Ainsi, l'utilisation d'un connecteur un peu plus long pourrait permettre d'efficacement lier les deux unités du complexe plutôt qu'une seule, ce qui était fort probablement une lacune de la première génération de dimères. Aussi, le motif triène est beaucoup plus rigide que le connecteur moléculaire allylique des dimères **1** et **3** (Figure 3.5).

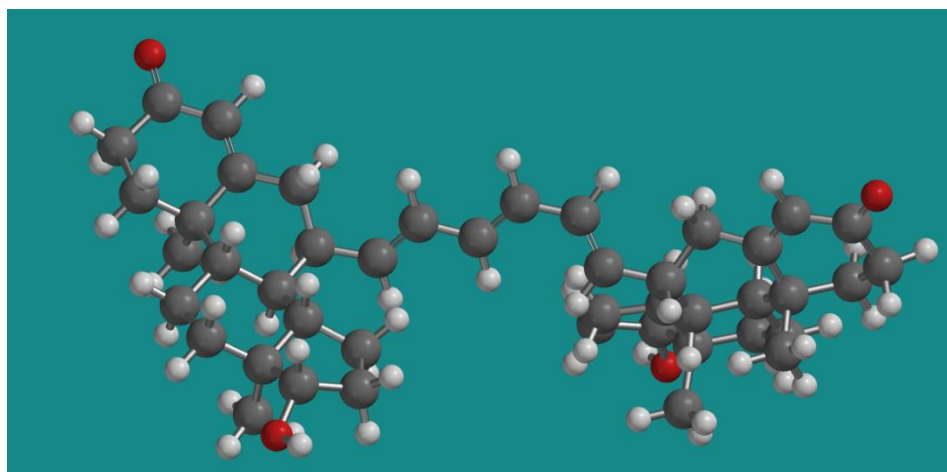


Figure 3.5 Simulation tridimensionnelle de la structure du dimère **7**.

Avec sa structure hélicoïdale rigide, le connecteur de type triène pourra empêcher le bon repliement des dimères et des RA. En effet, un connecteur moléculaire trop flexible pourrait permettre au complexe homodimérique d'adopter une conformation proche de sa conformation habituelle, ce qui n'empêchera pas la translocation de ce dernier dans le noyau cellulaire. Un connecteur rigide est impérativement requis pour induire des changements conformationnels importants dans la structure finale de l'homodimère.

Sinon, la position du connecteur en  $7\alpha$  est conservée puisque nous voulons étudier comment la différence du type de connecteur influence l'activité biologique. En changeant la position, il serait impossible de faire état de cette question. Il est à noter qu'à la base, la position  $7\alpha$  fut choisie, car elle se situe loin de l'énone sur le carbone 3 et de l'hydroxyle sur le carbone 17, qui sont les deux sites par lesquels les stéroïdes se lient au RA [85]. En fonctionnalisant trop près de ces sites, il est possible d'affecter

l'amarrage de l'androgène au récepteur. Un connecteur en position  $7\alpha$  se trouve donc au cœur du stéroïde, minimisant ces possibles problèmes. La stéréochimie du lien unissant le connecteur au squelette de l'androgène peut avoir un impact sur l'activité biologique, mais le plus important est d'obtenir un produit final où tous les centres chiraux sont contrôlés afin de ne pas avoir à déterminer quels énantiomères ou diastéréoisomères possèdent une activité biologique, ce qui serait très difficile à déterminer.

En plus du dimère de testostérone **7**, un dimère d'épitestostérone **8** et un dimère d'androstènedione **9** pourront être synthétisés. L'idée de fabriquer ces deux analogues est de comparer l'impact de la stéréochimie de l'hydroxyle du carbone 17 et le niveau d'oxydation sur l'activité biologique des dimères. Il faut noter que l'épitestostérone et l'androstènedione possèdent toutes deux des effets biologiques intéressants, dont l'habilité de se lier au RA [94,95]. Théoriquement, le dimère de testostérone naturelle **7** devrait être celui qui possède l'activité biologique la plus importante, car il peut potentiellement se lier plus fortement au RA que les dimères **8** et **9**. Ceci pourra toutefois être évalué par des tests *in vitro*.

L'analyse rétrosynthétique des dimères **A<sub>1-3</sub>** est présentée à la Figure 3.6. On constate que les dimères peuvent être assemblés en couplant les précurseurs appropriés **B<sub>1-3</sub>** à l'aide d'une réaction de métathèse d'oléfines. Cette stratégie a pour avantage d'être un moyen efficace de terminer la synthèse, puisque seulement un précurseur est requis pour la dernière réaction. Aussi, la métathèse d'oléfines est un outil de synthèse utile pour construire un dimère symétrique dont les unités ne sont reliées que par des liaisons carbone-carbone.

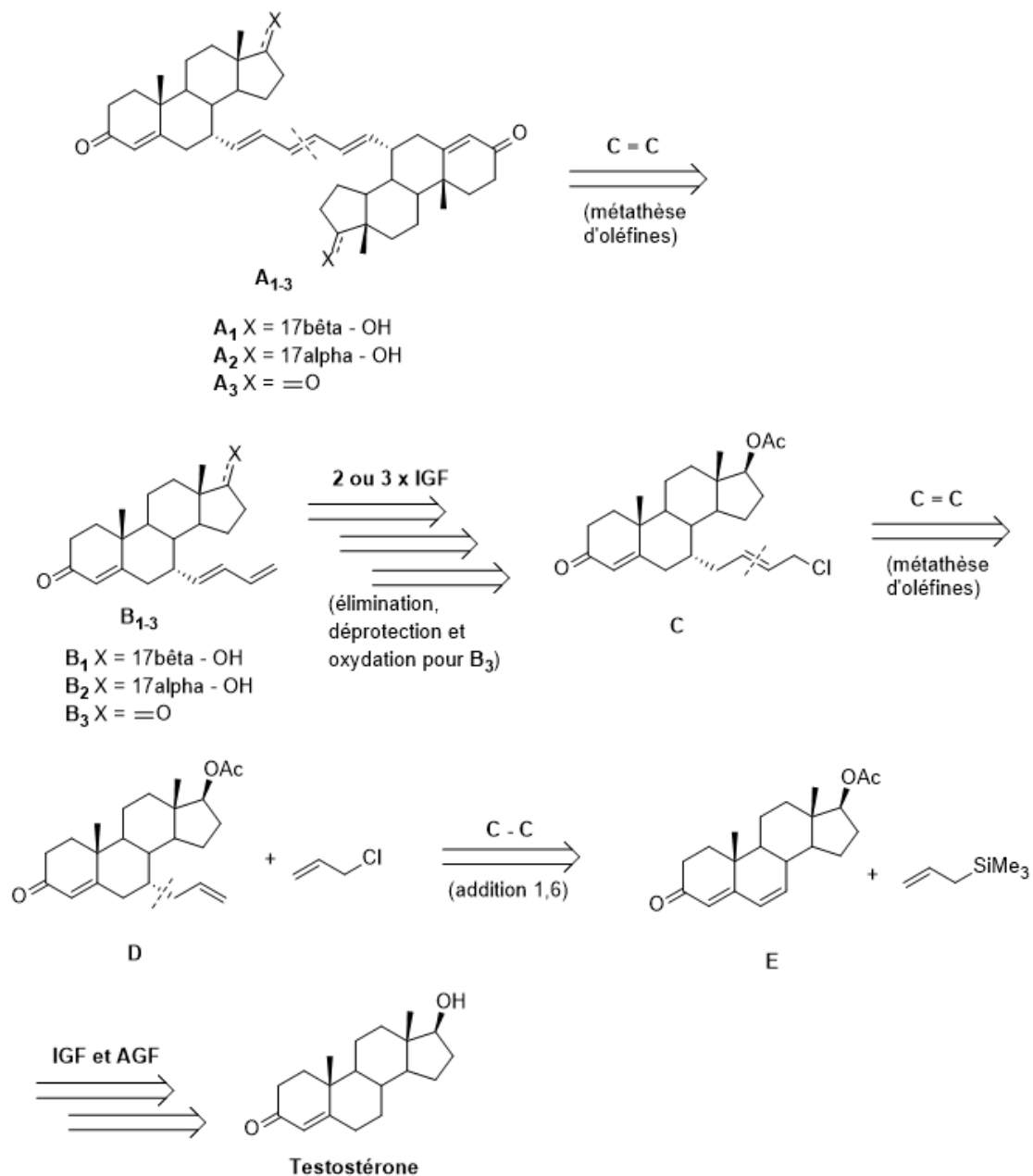


Figure 3.6 Analyse rétrosynthétique des dimères 7, 8 et 9.

Les dérivés de testostérone  $B_{1-3}$  sont porteurs d'une chaîne butadiène en position  $7\alpha$ . Afin de fabriquer ces précurseurs, il est possible de procéder à une réaction d'élimination E2' sur le chlorure correspondant dont l'hydroxyle sur le carbone 17 peut

également être protégé sous forme d'acétate. Cet hydroxyle pourra être oxydé afin de générer le précurseur **B**<sub>3</sub>. Le chlorure **C** peut être obtenu par l'intermédiaire d'une métathèse d'oléfine croisée entre le chlorure d'allyle et l'acétate de 7 $\alpha$ -allyltestostérone **D**. La molécule **D** est un composé phare de notre laboratoire, car il s'agit d'un intermédiaire très utile afin de fabriquer des stéroïdes fonctionnalisés en position 7 $\alpha$ . L'acétate de 7 $\alpha$ -allyltestostérone peut être obtenu par une réaction d'Hosomi-Sakurai à l'aide de l'allyltriméthylsilane sur la diénone **E**, qui elle-même peut être générée en diacétylant la testostérone puis en procédant à une séquence d'addition-élimination à l'aide du *N*-bromosuccinimide et du carbonate de césium.

### 3.2.2 Conception d'une série de dimères d'androgènes fonctionnalisés en position 17 $\alpha$

Le deuxième objectif du projet de recherche est de concevoir une série de dimères d'androgènes possédants un connecteur moléculaire à la position 17 $\alpha$ . Bien qu'il soit risqué de fonctionnaliser un stéroïde près des sites où ce dernier se lie au RA, plusieurs inhibiteurs hormonaux connus sont fonctionnalisés à cette position, ce qui la rend attrayante pour l'élaboration de drogues antiandrogéniques [96,97]. Le carbone 17 peut donc être utilisé pour fabriquer des dimères.

Les connecteurs moléculaires de cette série seront de type alcénique, comme pour les dimères de Dominic Bastien. Bien que ces dimères puissent être flexibles, la voie de synthèse employée permettra de fabriquer des analogues de longueurs variables, afin d'évaluer l'effet de la taille du connecteur moléculaire sur l'activité antiandrogénique (Figure 3.7).



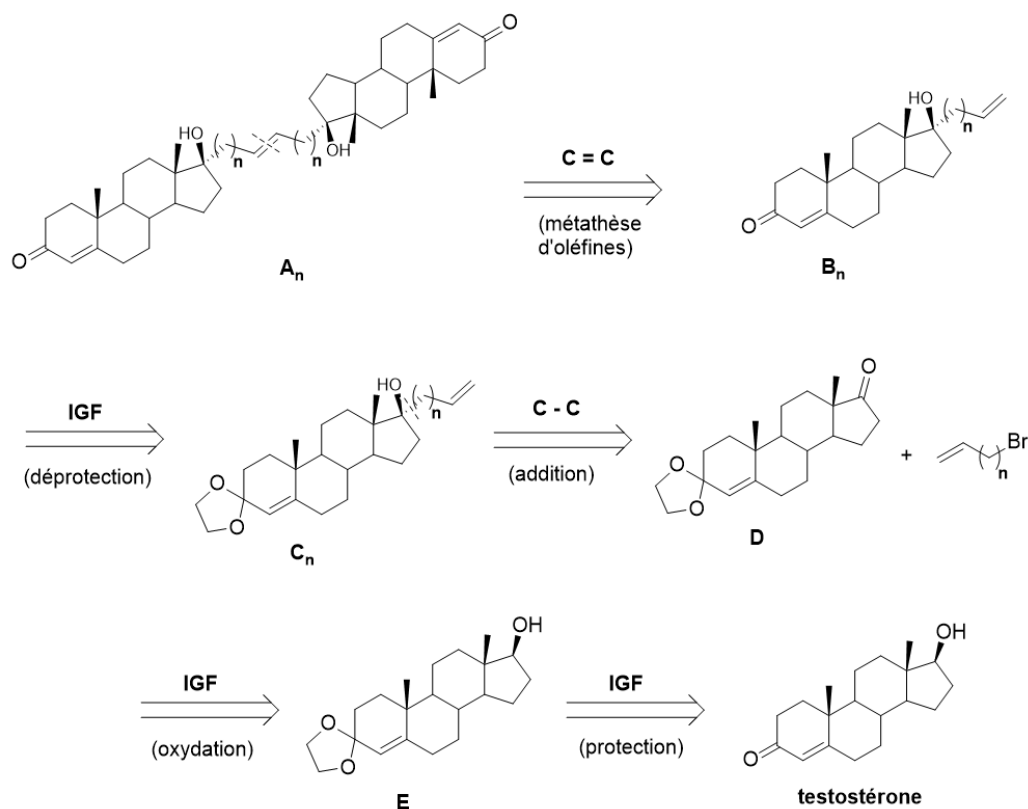


Figure 3.7 Analyse rétrosynthétique des dimères possédant un connecteur moléculaire alcénique en position 17 $\alpha$ .

Le motif général de cette série de dimères est représenté par la structure **A<sub>n</sub>** de la Figure 3.7. Comme pour la voie de synthèse de la première série de dimères, il sera possible de compléter cette dernière à l'aide d'une réaction de métathèse d'oléfines à partir des molécules **B<sub>n</sub>**. Ce faisant, la voie de synthèse sera symétrique. Un avantage de cette voie synthétique est que la molécule **B<sub>1</sub>** est connue sous le nom d'allyltestostérone et possède des propriétés antiandrogéniques [98]. En plus de l'étude sur les dimères, il sera intéressant d'évaluer l'impact de la longueur de la chaîne latérale sur l'effet biologique des précurseurs. Afin de construire les molécules **B<sub>n</sub>**, il est possible de simplement procéder à une réaction d'addition avec l'halogénoalcène correspondant sur le stéroïde protégé **D**. Cette molécule peut être générée en oxydant la molécule **E**,

qui elle-même peut être produite en protégeant l'énone sur le carbone 3 de la testostérone sous forme d'acétal.

Un objectif secondaire du projet sera d'évaluer l'impact de la réduction des unités testostérone en unités DHT sur l'activité biologique des dimères. En effet, le ligand ayant la plus grande affinité avec le RA étant la DHT, il est fort probable qu'une fois dans l'organisme, l'enzyme 5 $\alpha$ -réductase vient réduire les unités testostérone des dimères avant que ces derniers ne se lient aux RA. Or, il nous est présentement impossible d'évaluer à quel point cet enzyme est capable de réagir avec les dimères et si cela affecte le potentiel antiandrogénique de ces derniers. Afin d'évaluer cela, il sera possible de construire un dimère de DHT en employant la voie de synthèses illustrée à la Figure 3.7. Il s'agira simplement d'utiliser la DHT comme produit de départ de la synthèse au lieu de la testostérone. Seul l'analogue du dimère A<sub>1</sub> sera fabriqué étant donné que c'est celui qui devrait théoriquement avoir le plus de difficulté à réagir avec l'enzyme 5 $\alpha$ -réductase, en raison de l'encombrement occasionné par la proximité des deux unités stéroïdiennes. À partir de ces résultats, il sera possible de tirer des conclusions sur la capacité qu'à l'enzyme 5 $\alpha$ -réductase de réduire des dimères de la testostérone.

### 3.2.3 Évaluation des propriétés biologiques et de l'affinité avec le cytochrome P450 3A4 des nouveaux composés

Une fois les nouvelles molécules synthétisées, des tests *in vitro* seront réalisés sur ces dernières afin d'évaluer certains paramètres biologiques tels que l'activité antiproliférative et la capacité antiandrogénique. Les résultats de ces tests indiqueront si les molécules pourraient avoir une quelconque application hormonothérapeutique vis-à-vis le cancer de la prostate. Les résultats seront également comparés à l'acétate de cyprotérone, un médicament stéroïdien antiandrogénique utilisé en clinique. Cette comparaison permettra de déterminer le pouvoir thérapeutique *in vitro* des nouveaux

composés par rapport à une référence connue. Par ailleurs, certains composés seront testés pour leur affinité avec le site actif du cytochrome P450 3A4. Des tests de co-cristallisation seront réalisés sur les molécules les plus prometteuses, ce qui pourrait éventuellement mener à l'obtention d'un cliché de diffraction des rayons X du site catalytique de ce cytochrome. Les conditions et les protocoles des tests biologiques et des tests avec le cytochrome P450 3A4 seront décrits dans les chapitres IV et V.

## CHAPITRE IV

### RÉSULTATS - PARTIE I

#### 4.1 Avant-Propos

Les résultats présentés dans ce chapitre sont présentés dans l'article scientifique ayant pour titre : « *Innovative C2-symmetric testosterone and androstenedione dimers: Design, synthesis, biological evaluation on prostate cancer cell lines and binding study to recombinant CYP3A4* ». Ce travail rapporte la conception, la synthèse, l'évaluation biologique et l'évaluation de l'affinité pour le cytochrome P450 3A4 d'une série d'androgènes dimériques. Ces travaux sont publiés dans le journal scientifique *European Journal of Medicinal Chemistry*, **220**, 2021, 113496.

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113496>

Les auteurs et leurs coordonnées sont présentés dans l'ordre :

**Alexis Paquin, B.Sc.**

Étudiant à la maîtrise en chimie

Département de Chimie, biochimie et physique,

Université du Québec à Trois-Rivières, C.P. 500, Trois-Rivières, QC, Canada, G9A 5H7

Courriel: [Alexis.Paquin@uqtr.ca](mailto:Alexis.Paquin@uqtr.ca)

**Yassine Oufqir, B.Sc.**

Étudiant à la maîtrise en biologie cellulaire et moléculaire

Département de Biologie médicale

Université du Québec à Trois-Rivières, C.P. 500, Trois-Rivières, QC, Canada, G9A 5H7

Courriel: [Yassine.Oufqir@uqtr.ca](mailto:Yassine.Oufqir@uqtr.ca)

**Irina F. Sevrioukova, Ph.D.**

Chercheuse en cristallographie

Department of Molecular Biology and Biochemistry,

University of California, Irvine, CA, United, United States, 92697

Courriel: [Sevrioui@uci.edu](mailto:Sevrioui@uci.edu)

**Carlos Reyes-Moreno, Ph.D.**

Professeur de biologie médicale

Département de Biologie médicale

Université du Québec à Trois-Rivières, C.P. 500, Trois-Rivières, QC, Canada, G9A 5H7

Courriel: [Carlos.Reyes-Moreno@uqtr.ca](mailto:Carlos.Reyes-Moreno@uqtr.ca)

**Gervais Bérubé, Ph.D.**

Professeur de chimie organique

Département de Chimie, biochimie et physique,

Université du Québec à Trois-Rivières, C.P. 500, Trois-Rivières, QC, Canada, G9A 5H7

Courriel: [Gervais.Berube@uqtr.ca](mailto:Gervais.Berube@uqtr.ca)

## 4.2 Résumé

Les dimères d'androgènes possèdent la propriété de se lier au RA dans les cytoplasmes des cellules hormonodépendantes et d'inhiber la croissance cellulaire. Continuant dans la même veine que des travaux précédemment réalisés dans le groupe de recherche, nous avons entrepris de concevoir une deuxième génération de dimères d'androgènes possédant un connecteur moléculaire en position  $7\alpha$ , dans le but de s'en servir comme bloqueur hormonal pour le traitement du cancer de la prostate hormonodépendant. La deuxième génération de dimères compte un dimère de testostérone, un dimère d'épitéstostérone et un dimère d'androstènedione possédant chacun un connecteur moléculaire de type triène. Ce type de connecteur est plus rigide que le connecteur alcénique de la première génération, ce qui bonifie les propriétés biologiques des nouveaux dimères. En effet, l'activité antiproliférative des dimères sur les cellules LNCaP est passée de  $30,3 \pm 0,7 \mu\text{M}$  pour le dimère le plus actif de la première génération à  $12,0 \pm 0,5 \mu\text{M}$  pour le dimère à base de testostérone de la deuxième génération. Ce composé possède d'ailleurs une activité antiproliférative environ 5 fois supérieure au CPA et peut inhiber totalement la croissance des cellules stimulées par la testostérone à seulement  $0,5 \mu\text{M}$ . Les tests d'affinité entre les dimères et le cytochrome P450 3A4 dénotent une constante de dissociation allant de  $1,4$  à  $5,5 \mu\text{M}$ . De plus, un stéroïde possédant un cyclohexène porteur d'une fonction anhydride en position  $7\alpha$  fut également synthétisé et testé pour son activité antiproliférative. Il a été découvert que ce composé possède une cytotoxicité modeste avec un  $\text{IC}_{50}$  de  $130,6 \pm 0,5 \mu\text{M}$  sur les cellules LNCaP.

## **Innovative $C_2$ -symmetric testosterone and androstenedione dimers: Design, synthesis, biological evaluation on prostate cancer cell lines and binding study to recombinant**

### 4.3 Abstract

The synthesis of two isomeric testosterone dimers and an androstenedione dimer is reported. The design takes advantage of an efficient transformation of testosterone leading to the synthesis of the key diene,  $7\alpha$ -(buta-1,3-dienyl)-4-androsten-17 $\beta$ -ol-3-one, through an elimination reaction. It was found that in some instances the same reaction led to partial epimerization of the 17 $\beta$ -hydroxyl group into the 17 $\alpha$ -hydroxyl group. The specific orientation of the hydroxyl function was confirmed by NMR spectroscopy. Capitalizing on this unforeseen side reaction, several dimers were assembled using an olefin metathesis reaction with Hoveyda-Grubbs catalyst. This led to the formation of two isomeric testosterone dimers with 17 $\alpha$ -OH or 17 $\beta$ -OH (**14a** and **14b**) as well as an androstenedione dimer (**14**). The new dimers and their respective precursors were tested on androgen-dependent (LNCaP) and androgen independent (PC3 and DU145) prostate cancer cells. It was discovered that the most active dimer was made of the natural hormone testosterone (**14b**) with an average  $IC_{50}$  of 13.3  $\mu$ M. In LNCaP cells, **14b** was ~5 times more active than the antiandrogen drug cyproterone acetate ( $IC_{50}$  of 12.0  $\mu$ M vs. 59.6  $\mu$ M, respectively). At low concentrations (0.25-0.5  $\mu$ M), **14a** and **14b** were able to completely inhibit LNCaP cell growth induced by testosterone or dihydrotestosterone. Furthermore, cross-reactivity of androgen-based dimers with sterol-metabolizing cytochrome P450 3A4 was explored and the results are disclosed herein.

#### 4.4 Introduction

Modern chemistry along with the refinement of modern analytic methods and development of sensitive spectroscopic tools led to the discovery of important new chemical entities and medicines [1]. Hence, researchers continue to be captivated by ever more complex molecules. Amongst them, hybrid and dimeric molecules are subject to significant scrutiny by scientists [2-9]. This manuscript reports the design and synthesis of steroid dimers as prospective “natural antiandrogens” for the treatment of prostate cancer (PCa). It is well known that steroid receptors dimerize upon interaction with their cognate hormones. This biological response occurs for the androgen receptor (AR) upon its binding with the androgens, testosterone (TS) and dihydrotestosterone (DHT). Dimerization of AR was shown to proceed via the ligand-binding domain and is induced by receptor agonists but not antagonists [10]. Hence, the design of a steroid-based antiandrogen might be key for the discovery of new therapeutics and for studying the AR, as well as other important biological macromolecules involved in sterol metabolism, such as cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) [11,12].



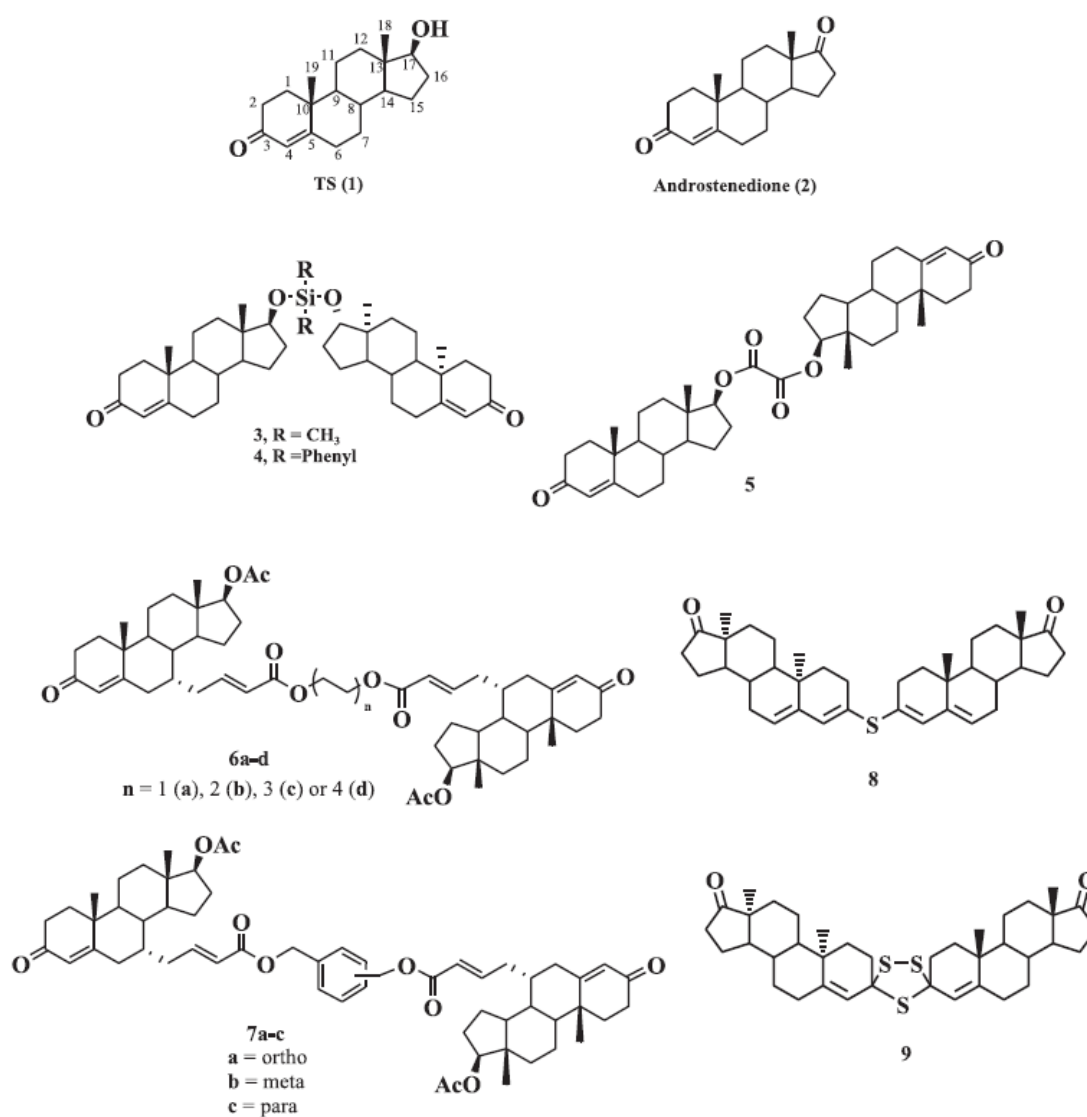


Figure 4.1 TS (1) and androstenedione (2) with diverse examples of known dimers linked by a silyl ether (3,4), diester (5-7) or sulfur bridge (8,9).

Several examples of TS (1) and androstenedione (2) dimers are already described in the literature (Figure 4.1). Some compounds, such as the dimeric silyl ethers 3 and 4 and the oxalate dimer 5, were designed to act as prodrugs of TS in animal models [13,14]. Alternatively, dimers 6a-d and 7a-c linked by the aliphatic or aromatic chains, respectively, were made to work as possible antiandrogens [15]. Androstenedione (2)

was also derivatized to the thioether dimer **8** and the trithiolane dimer **9** [16]. The latter compound exhibited antifungal activity against *Saccharomyces cerevisi* [17].

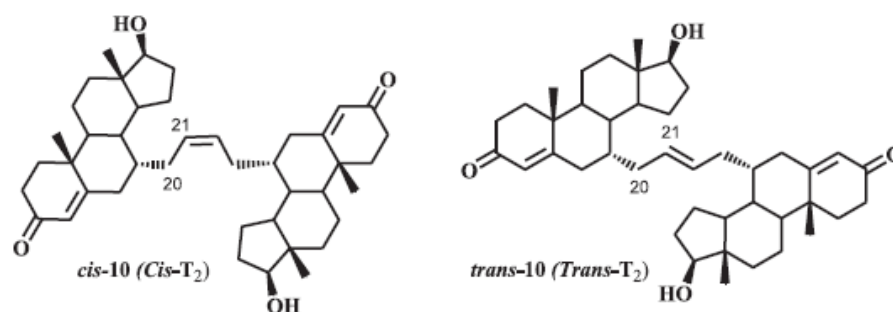


Figure 4.2 Structure of known isomeric TS dimers (*cis*-**10** and *trans*-**10**) linked by a but-2-ene carbon atom chain.

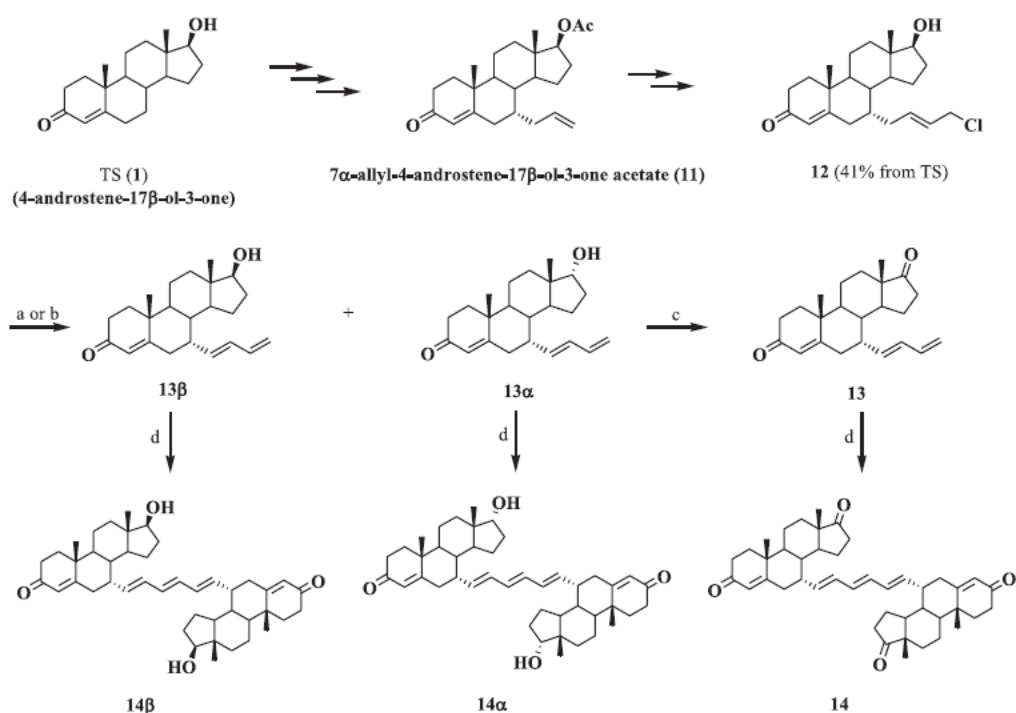
We have also investigated the synthesis and biological potential of two isomeric TS dimers, *cis*-**10** and *trans*-**10** (Figure 4.2) [11]. The MTT antiproliferative assay showed that the *cis* isomer was as active as CPA, with  $IC_{50}$  of 30.3  $\mu$ M and 24.7  $\mu$ M on LNCaP (AR+) and PC3 (AR-) PCa cells, respectively. In addition, these two molecules were used to study allosteric effects in substrate binding to CYP3A4 by spectroscopic methods [12]. It was discovered that *cis*-**10** binds to CYP3A4 stronger and causes more pronounced conformational changes in the ferric and  $Fe^{2+}$ -CO states.

In Canada, the lung, breast, colorectal and prostate cancers are most prevalent, with roughly 107,700 new cases estimated in 2020 [18]. This is ~48% of all new cancer cases, where PCa alone represents one fifth. Among the estimated 23,300 new cases in men, 18% will be lethal. Thus, PCa is still the most common cancer in men [18] and can be cured successfully only if detected at an early stage. Nevertheless, new therapeutics are persistently sought by many research teams to fight this disease. The vast majority of malignancies are detected at stage I or II and classified as hormonedependent [18,19]. Hence, it is conceivable to use the AR as a biological target to design site-specific antiandrogens for treatment of PCa. Herein, we report the

synthesis and properties of three new androgen-based dimers linked by an  $\alpha,\omega$ -hexatrienyl chain at carbon 7 of the steroid nucleus. We also report on their binding interactions with CYP3A4.

#### 4.5 Design and chemistry

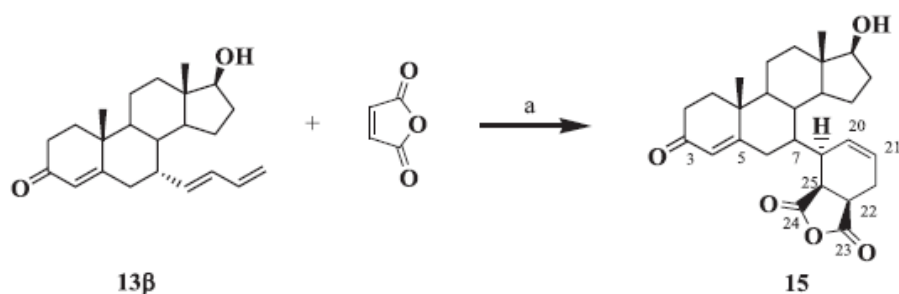
TS and DHT are natural substrates for the AR [10]. Hence, if transformed adequately, they can be used as carrier molecules to target prostate tissue via AR activation or inactivation. Capitalizing on our earlier work, the  $7\alpha$  position of TS was selected for dimer linkage, as it is suitably located away from the important binding sites, namely the 3-C=O and 17-OH groups, crucial for hydrogen bonding with AR [11,15]. These two key functional groups must remain intact to promote strong interactions with the receptor [11].



Scheme 4.1 Preparation of TS dimers and their precursors. **Reagents and conditions:** (a)  $[\text{Ru}(\text{C}_5\text{Me}_5)(\text{MeCN})_3] [\text{PF}_6]$ ,  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $\text{N}_2$ , 48h (**13β**, 66%); or (b)  $[\text{Ru}(\text{C}_5\text{Me}_5)(\text{MeCN})_3] [\text{PF}_6]$  (lot #MKCK1977),  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $\text{N}_2$ , 48 h (**13β**, 17% and **13α**, 18%); (c) Mixture of **13α** and **13β**, pyridinium chlorochromate,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 2.5 h (**13**, 63%); (d) Relevant diene, Hoveyda-Grubb's catalyst 2nd generation,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{N}_2$ , 36 h (**13β** /**14β**, 63%; **13α** /**14α**, 34%; **13** /**14**, 77%).

The synthetic methodology for the preparation of new dimers is described in Scheme 4.1. As reported earlier, TS was efficiently modified by a five-step reaction sequence into the intermediate 7α-allyl-4-androstene-17β-ol-3-one acetate (**11**) [11]. The 7α-(4-chloro-but-2-enyl)-4-androstene-17β-ol-3-one intermediate (**12**) was obtained from TS using the Hoveyda-Grubbs metathesis reaction with allyl chloride, giving 41% overall yield [20]. Afterwards, treatment of **12** with a mixture of cesium carbonate and the ruthenium catalyst led to formation of the key intermediate, 7α-(buta-1,3-dienyl)-4-

androst-17 $\beta$ -ol-3-one (**13 $\beta$** ), with 66% yield [21]. Upon treatment with the Hoveyda-Grubbs catalyst, the latter derivative gave 63% of the TS dimer **14 $\beta$** . Similarly, using a different lot of the ruthenium catalyst, a mixture of **13 $\beta$**  and **13 $\alpha$**  isomeric dienes was obtained in 17% and 18% yield, respectively. Stereochemistry of **13 $\beta$**  (a TS derivative) and **13 $\alpha$**  (an epitestosterone (epiTS) derivative) was easily confirmed by comparison of the  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shift of the angular 18-CH $_3$  group on the estrogenic steroid nucleus. It is reported that the angular 18-CH $_3$  chemical shift for 17 $\beta$ - and 17 $\alpha$ -estradiol molecules is 11.68 ppm and 17.61 ppm, respectively [22]. Similarly, we observed the angular 18-CH $_3$  chemical shifts of 11.0 ppm and 16.9 ppm for **13 $\beta$**  and **13 $\alpha$** , respectively, confirming the stereochemistry of the 17-OH group on the TS nucleus. Also by  $^{13}\text{C}$  NMR, the 17-C was located at 81.3 ppm and at 79.5 ppm for the **13 $\beta$**  and **13 $\alpha$**  isomers, respectively. The  $^1\text{H}$  NMR 17-CH signal appears at 3.62 ppm as a triplet for **13 $\beta$**  and at 3.73 ppm as a doublet for **13 $\alpha$** , further confirming the stereochemistry at 17-C.



Scheme 4.2 Preparation of the 4-(17 $\beta$ -hydroxy-4-androst-3-one-7 $\alpha$ -yl)-3a,4,7,7a-tetrahydro-isobenzofuran-1,3-dione **15**. **Reagents and conditions:** (a) Diene **13 $\beta$** , maleic anhydride, toluene, 3 h at 110 $^{\circ}\text{C}$  (19% yield).

Even though the epimerization was a surprising side reaction, it was decided to take advantage of this result and produce the epiTS dimer **14 $\alpha$**  for comparative analysis with the “natural” TS dimer **14 $\beta$**  and the androstenedione dimer **14**. The precursor **13** for the synthesis of androstenedione dimer was obtained by oxidation of the 7 $\alpha$ -(buta-1,3-

dienyl)-4-androsten-17 $\beta$ -ol-3-one (**13 $\alpha$ / $\beta$** ) isomer mixture with pyridinium chlorochromate on alumina in dichloromethane with 63% yield [23]. Again, the synthesis of dimers **14 $\alpha$**  and **14** was performed using a metathesis reaction condition and the 2<sup>nd</sup> generation Hoveyda-Grubbs catalyst with 34% and 77% yield, respectively [24,25]. In order to further characterize the diene **13 $\beta$** , a Diels-Alder reaction was performed with maleic anhydride in toluene at reflux to yield 19% of the adduct **15** (Scheme 4.2) [26]. All new molecules were fully characterized by infrared (IR) and nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR) spectroscopy and by high resolution mass spectrometry (HRMS) analyses.

## 4.6 Results and discussion

### 4.6.1 Antiproliferative activity of the new compounds

The antiproliferative activity of compounds **13**, **13 $\alpha$** , **13 $\beta$** , **14**, **14 $\alpha$** , **14 $\beta$**  and **15** was measured using the MTT assay on three PCa cell lines: LNCaP (AR+), PC3 (AR-) and DU145 (AR-) [27,28]. The antiandrogen drug cyproterone acetate (CPA) was used as a positive control to better contrast the biological activity of new steroid dimers and their respective precursors. The results from the antiproliferative activity assay are presented in Table 4.1, where IC<sub>50</sub> is the compound concentration inhibiting cell growth by 50%. The results show that the diene precursors **13**, **13 $\alpha$** , **13 $\beta$**  were generally more active than CPA on all tested PCa cells. For instance, their IC<sub>50</sub> was in the 16.6-33.5  $\mu$ M range vs. 59.6  $\mu$ M for CPA on LNCaP (AR+) cells. On PC3 (AR-) cells, IC<sub>50</sub>s varied from 31.5  $\mu$ M to 51.7  $\mu$ M relative to 56.9  $\mu$ M for the reference drug, and from 21.3  $\mu$ M to 29.0  $\mu$ M vs. 50.7  $\mu$ M on the AR- DU145 cells (Table 4.1).

Compound	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>		
	LNCaP (AR <sup>+</sup> )	PC3 (AR <sup>-</sup> )	DU145 (AR <sup>-</sup> )
<b>13α</b>	16.6	31.5	23.8
<b>13β</b>	28.8	34.1	29.0
<b>13</b>	33.5	51.7	21.3
<b>14α</b>	37.1	44.5	21.4
<b>14β</b>	12.0	13.6	14.4
<b>14</b>	72.7	29.0	53.6
<b>15</b>	130.6	62.5	86.5
*CPA	59.6	56.9	50.7

<sup>a</sup> Inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) is concentration of drug inhibiting cell growth by 50%.

\*Cyproterone acetate

Table 4.1 Antiproliferative activity of novel TS dimers (compound **14α** and **14β**) and androstenedione dimer (compounds **14**), their respective precursors (**13α**, **13β** and **13**), the Diels-Alder adduct **15** and CPA on androgen-sensitive (LNCaP) and androgen-insensitive (PC3 and DU145) human prostate adenocarcinoma cell lines.

The best diene precursor was **13α** with IC<sub>50</sub> of 16.6 μM, which is about 4 times lower than that for CPA on the LNCaP (AR<sup>+</sup>) cells. The two TS dimers, **14α** and **14β**, displayed most interesting biological results. The **14β** dimer was the most potent inhibitor on all cells tested, with IC<sub>50</sub> of 12.0, 13.6 and 14.4 μM on LNCaP, PC3 and

DU145 cell lines, respectively. Moreover, **14 $\beta$**  was about 5 times more active than CPA on LNCaP cells. The epiTS dimer **14 $\alpha$**  was less active than **14 $\beta$** , with IC<sub>50</sub> varying from 21.4  $\mu$ M to 44.5  $\mu$ M on different cell lines. Likewise, the androstenedione dimer **14** had IC<sub>50</sub> in the 29.0-72.7  $\mu$ M range. The Diels-Alder adduct **15** was the least active compound, with IC<sub>50</sub> ranging from 62.5  $\mu$ M to 130.6  $\mu$ M on all PCa cells tested. We were surprised to observe no obvious selective activity of the best dimer **14 $\beta$**  on the AR+ PCa cells (Table 1). Nevertheless, it is known that there are often some discrepancies between *in vitro* and *in vivo* experiments [29,30], so **14 $\beta$**  could potentially show better selectivity in *in vivo* settings.

#### 4.6.2 Antiandrogenic potential of testosterone dimer (**14 $\beta$** ) and epitestosterone dimer (**14 $\alpha$** )

The antiandrogenic potential of **14 $\beta$**  and **14 $\alpha$**  was evaluated *in vitro* by monitoring the inhibition of cell proliferation induced by TS and DHT in LNCaP (AR+) PCa cells. The results are shown in Figures 4.3 and 4.4.



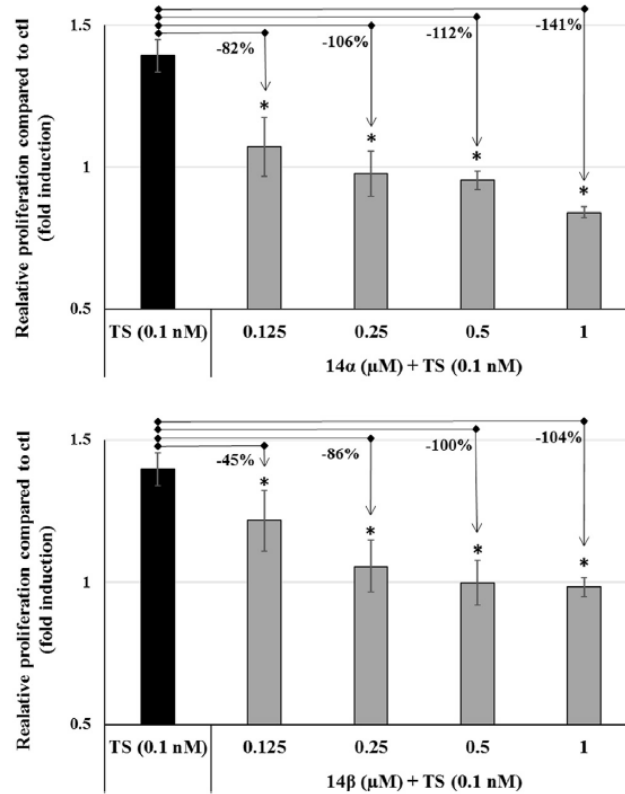


Figure 4.3 Inhibition of TS-induced growth of LNCaP PCa cells by **14α** and **14β** dimers. Cells were cultured for 48 h in DMSO 0.1% (control), TS 0.1 nM alone, or TS 0.1 nM in combination with **14α** and **14β** dimers at different concentrations. Data is expressed as fold induction of cell proliferation compared to control (0.1% DMSO in culture media). Error bars represent  $\pm$  SEM (n = 3). Statistical analysis: \*p < 0.05 by two-way ANOVA, Bonferroni's post-test compared to TS.

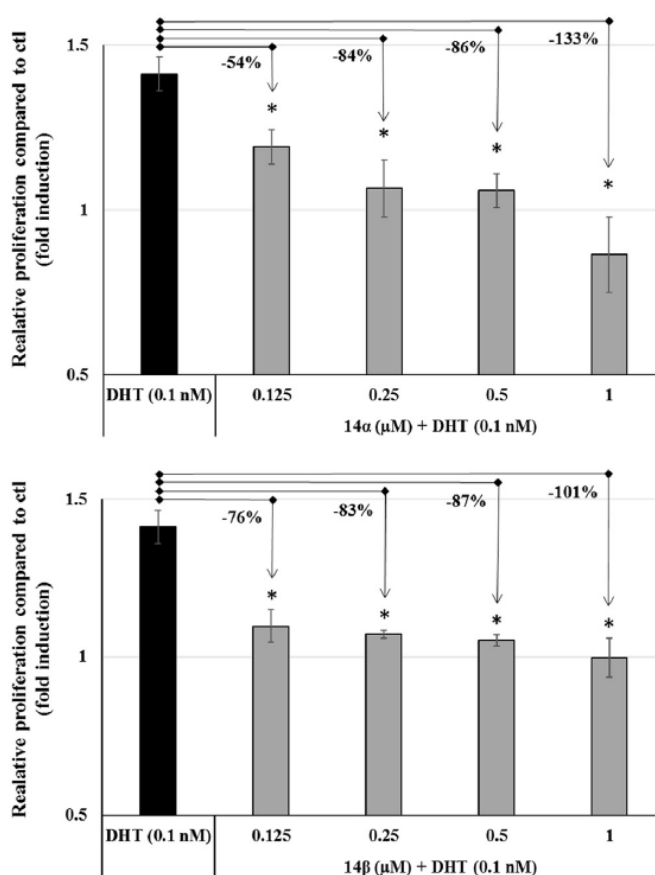


Figure 4.4 Inhibition of DHT-induced growth of LNCaP PCa cells by **14α** and **14β** dimers. Cells were cultured for 48 h in DMSO 0.1% (control), DHT 0.1 nM alone, or DHT 0.1 nM in combination with **14α** and **14β** dimers at different concentrations. Data is expressed as fold induction of cell proliferation compared to control (0.1% DMSO in culture media). Error bars represent  $\pm$  SEM (n = 3). Statistical analysis: \* $p < 0.05$  by two-way ANOVA, Bonferroni's post-test compared to DHT.

We were able to demonstrate in a competitive assay that both the TS dimer **14β** and the epiTS dimer **14α** were able to fully inhibit the proliferative effect induced by 0.1 nM TS or DHT on LNCaP (AR+) PCa cells (Figures 4.3 and 4.4). Cell growth stimulation by TS and DHT alone (black bars) led to about 1.39 and 1.41 fold induction, respectively, compared to the control cells treated with 0.1% dimethyl sulfoxide

(DMSO) in culture media (relative cell proliferation = 1). For the TS-induced cell proliferation, the dimers **14 $\alpha$**  and **14 $\beta$**  were 100% effective at a concentration of 0.25  $\mu$ M and 0.5  $\mu$ M, respectively (Figure 4.3). Of note, at 1  $\mu$ M concentration, **14 $\alpha$**  and **14 $\beta$**  reduced TS-induced cell proliferation to 84% and 98% of the initial (non-stimulated) level, respectively (Figure 4.3). Relative to the proliferative response induced by 0.1 nM TS, the reduction was ~141% and 104%, respectively.

In contrast, for the DHT-induced cell proliferation, both dimers were 100% effective at a concentration of 1  $\mu$ M (Figure 4.4). It is important to indicate that (i) even at 0.125  $\mu$ M concentration both dimers were able to inhibit at least 45% of the growth induced by TS and DHT; (ii) under these conditions **14 $\alpha$**  inhibited 82% of LNCaP cell growth induced by TS; and (iii) the effective concentration levels (0.125  $\mu$ M - 1  $\mu$ M) were well below the IC<sub>50</sub>s of the dimers on LNCaP cells (see Table 4.1). However, it should be mentioned that the pronounced inhibitory effect of **14 $\alpha$**  and **14 $\beta$**  observed at 1  $\mu$ M concentration might be due to their dual anti-proliferative and anti-androgenic actions. As Figure 4.5 shows, **14 $\alpha$**  and, to a larger extent, **14 $\beta$**  display higher cytotoxic activity on LNCaP cells than CPA within a wide concentration range.

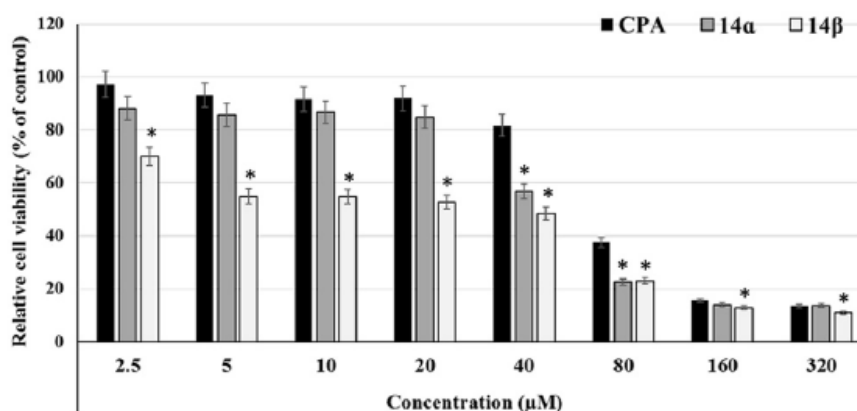


Figure 4.5 Comparative effects of CPA versus **14α** or **14β** dimers on the growth of LNCaP PCa cells. Cells were cultured for 48 h in the presence of DMSO 0.1% (control), and different concentrations of either CPA, **14α** or **14β** dimers. Relative cell viability data is presented as percent of control (0.1% DMSO in culture media; color coding indicated). Error bars represent  $\pm$  SEM (n = 3). Statistical analysis: \* $p < 0.05$  by two-way ANOVA, Bonferroni's post-test compared to each CPA concentration.

#### 4.6.3 Interaction of steroid dimers with recombinant CYP3A4

Androgens and androgen receptor signaling regulate prostate growth/homeostasis and play a crucial role in prostate cancer pathogenesis. Systemic androgen levels are maintained through *de novo* synthesis and metabolism. One important enzyme participating in steroid metabolism is CYP3A4, which oxidizes TS, androstenedione and DHT to biologically less active derivatives [31,32]. Moreover, there is experimental evidence that CYP3A4 can simultaneously bind multiple sterol molecules [12,33]. Therefore, it was of interest to investigate whether the TS dimers (**14α** and **14β**) and androstenedione dimer (**14**) can bind to and alter the functional activity of CYP3A4.

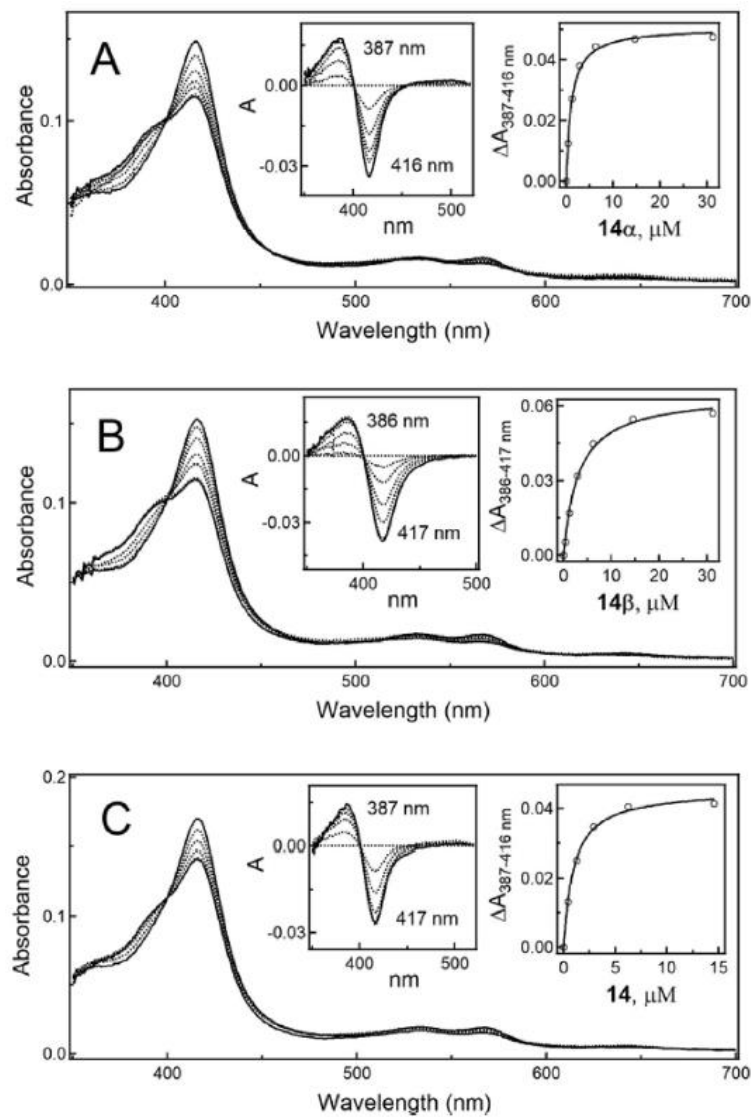


Figure 4.6 A-C, Spectral changes in CYP3A4 induced by TS dimers **14 $\alpha$** , **14 $\beta$**  and **14**, respectively. Absorbance spectra of 2  $\mu$ M CYP3A4 at different ligand concentrations were recorded in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, at room temperature. Left insets are the difference spectra; right insets are titration plots with hyperbolic fittings. The derived  $K_d$  values are given in Table 4.2.

Compound	$K_d^a$ $\mu\text{M}$	high spin %	$\text{IC}_{50}^b$ $\mu\text{M}$
<b>14<math>\alpha</math></b>	1.6 $\pm$ 0.3	46 $\pm$ 3	22 $\pm$ 2
<b>14<math>\beta</math></b>	5.5 $\pm$ 0.7	49 $\pm$ 3	1.2 $\pm$ 0.2
<b>14</b>	1.4 $\pm$ 0.2	36 $\pm$ 2	3.6 $\pm$ 0.4
<i>cis</i> - <b>10</b> <sup>c</sup>	0.37 $\pm$ 0.3	99 $\pm$ 1	0.8 $\pm$ 0.1
<i>trans</i> - <b>10</b> <sup>c</sup>	7.1 $\pm$ 0.5	65 $\pm$ 4	6.5 $\pm$ 0.5

<sup>a</sup> Spectral dissociation constant.

<sup>b</sup> Half-inhibitory concentration for the BFC debenzylase activity of CYP3A4.

<sup>c</sup> Described previously [11,12].

All values represent an average of three measurements with a standard deviation.

Table 4.2 Interaction of new TS dimers (**14 $\alpha$**  and **14 $\beta$** ), androstenedione dimer (**14**) and previously produced *cis*-**10** and *trans*-**10** with isolated recombinant CYP3A4.

Spectral measurements showed that all three compounds could approach the heme and cause a partial blue shift in the Soret band (type I spectral change), indicative of a low-to-high spin transition (Figure 4.6). The estimated dissociation constant ( $K_d$ ) for **14 $\alpha$**  and **14** was similar (1.6 and 1.4  $\mu\text{M}$ , respectively) and  $\sim$ 4-fold lower than for **14 $\beta$**  (Table 4.2). The dimers also inhibited the functional activity of CYP3A4, albeit to a different extent. The  $\text{IC}_{50}$  values for the 7-benzyloxy-4-(trifluoromethyl)coumarin (BFC) debenzylase activity measured in a soluble reconstituted system varied by an order of magnitude: from 1.2  $\mu\text{M}$  for **14 $\beta$**  to 22  $\mu\text{M}$  for **14 $\alpha$** , with no correlation with the respective  $K_d$  values. This is in contrast to the previously reported *cis*-**10** and *trans*-**10** dimers, whose  $\text{IC}_{50}$  and  $K_d$  correlated well (Table 4.2). As observed for the nanodiscincorporated CYP3A4 [12], *cis*-**10** was found to bind tightly and induced a

nearly complete high spin shift in isolated CYP3A4. The high spin content in *trans*-**10** bound CYP3A4 was only 65%, which is still considerably higher than in the **14 $\alpha$** -, **14 $\beta$** - and **14**-bound forms (Table 4.2). It should be noted that the  $K_d$  values for *cis*-**10** and *trans*-**10** derived for the soluble and membranous CYP3A4 [12] were highly similar, meaning that the lipid bilayer had no feasible effect on the binding affinity. Overall, *cis*-**10** was the strongest binder and inhibitor of CYP3A4. **14 $\beta$**  had a comparable  $IC_{50}$ , whereas **14** and **14 $\alpha$**  displayed the intermediate and the lowest inhibitory potency, respectively. This implies that **14 $\alpha$**  should have the lowest impact on CYP3A4-dependent androgen metabolism *in cellulo* and *in vivo*. In addition to the adult liver and intestines, where CYP3A4 is predominantly expressed, it has been detected at a transcript and protein level in prostate tissue, where decreased expression of CYP3A4 is associated with poorer cancer-specific survival [34,35]. None of the tested PCa cell lines appreciably express CYP3A4 and, thus, the inhibitory ability of sterol dimers is unlikely to interfere with the cell proliferation assays (Figures 4.3 and 4.4). However, because the dimer concentrations used in the latter assays (up to 1  $\mu$ M) and some of the  $IC_{50}$  values for CYP3A4 (Table 4.2) are comparable, the possibility that the dimers could cross-react with CYP3A4 and alter androgen metabolism exists and should be taken into account during further evaluation.

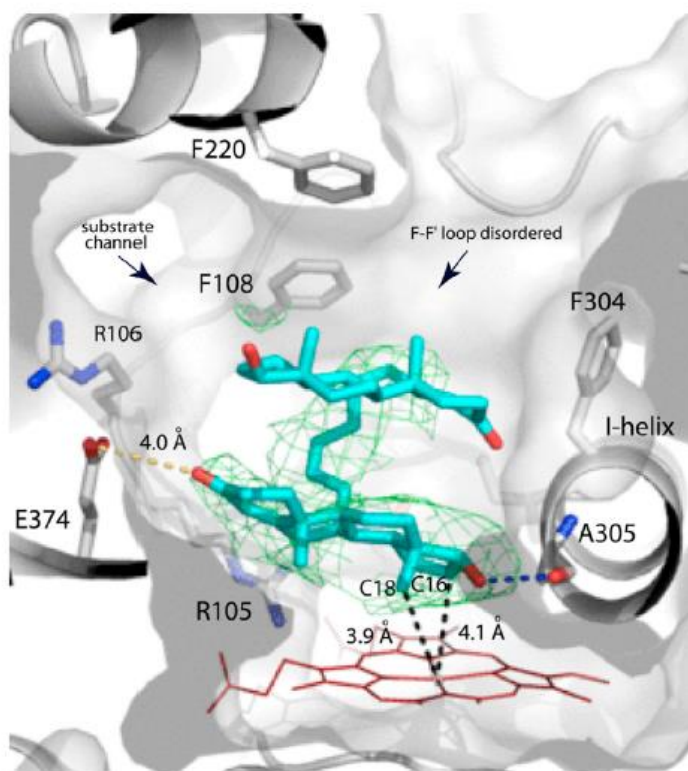


Figure 4.7 Crystal structure of CYP3A4 bound to the TS dimer *cis-10* (shown in cyan sticks). Sterol ring closest to the heme is well-defined and H-bonds via the hydroxyl group to the carbonyl oxygen of Ala305. Carbon atoms closest to the heme iron are labeled. The catalytic cavity is more open and, in addition to the substrate channel, can be accessed through the opening created by disorder in the F-F' loop (indicated by arrows). Green mesh is polder omit map contoured at  $3\sigma$  level.



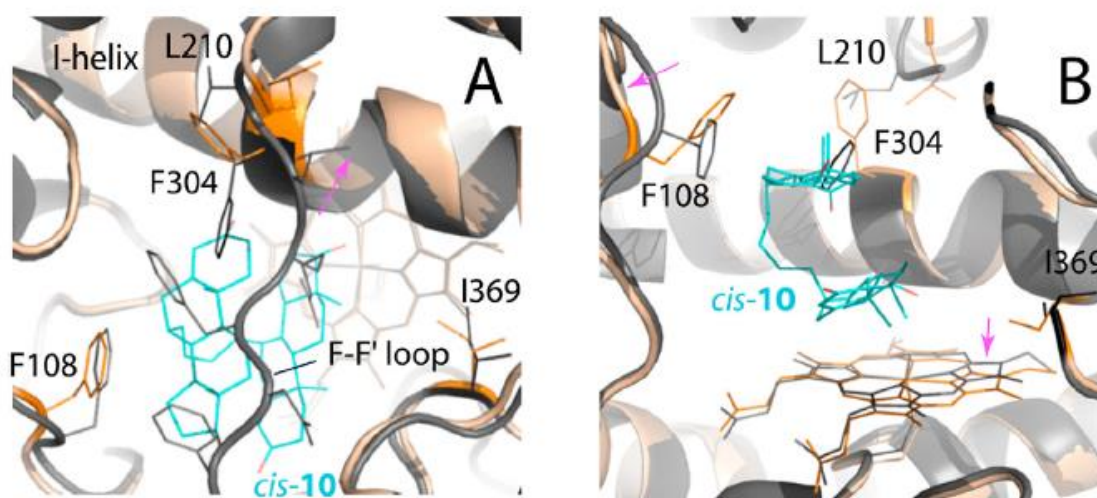


Figure 4.8 Conformational changes in CYP3A4 induced by *cis-10*. **A** and **B**, Top and side views at the active site of ligand-free (4I3Q structure; in black) and *cis-10* bound CYP3A4 (in beige and orange), respectively. Association of *cis-10* triggers displacement of the I-helix and the heme plane (by 1.2 and 0.7 Å, respectively), rotameric switch in Phe304, positional shift in the Phe108-centered loop (by 2.9 Å), and disorder in the F-F' fragment (residues 211-215). Movements of structural elements are indicated by arrows.

Crystal structure of CYP3A4 bound to *cis-10* - To obtain direct insights on the interaction of CYP3A4 with sterol dimers, we attempted to crystallize various complexes but succeeded only in solving the CYP3A4-*cis-10* structure to 2.75 Å resolution. In the crystal structure, *cis-10* is bound to the active site above the cofactor (Figure 4.7). The sterol moiety closest to the heme is well defined and H-bonds to Ala305 carbonyl via the hydroxyl group, while the opposite keto group forms weak electrostatic interactions with the Glu374 side chain. Comparison with the water-bound CYP3A4 structure (4I3Q; 2.6 Å) showed that the binding of *cis-10* imposes spatial constraints, forcing the I-helix to move aside and the heme plane tilt to downside by 1.2 and 0.7 Å, respectively (Figure 4.8). In addition to the vertical shift, the heme

cofactor has a slightly altered conformation of the vinyl groups (Figure 4.8B). This supports the resonance Raman spectroscopy results, which also indicate that association of CYP3A4 with *cis-10* leads to conformational changes in the porphyrin side chains [12]. The second sterol ring is poorly defined, possibly due to multiple conformations, and imposes steric hindrance with the Phe108-centered loop, shifting aside by 2.9 Å, and with the F-F' connecting fragment, part of which (residues 211-215) becomes disordered. As a result, the active site expands and becomes more solvent accessible. Importantly, the proximal sterol faces the heme with the D ring ( $\beta$ -side) and its two carbon atoms, C16 and C18, are only 4.1 and 3.9 Å away from the heme iron (Figure 4.7). This suggests that *cis-10* binds in a productive mode and could undergo oxidation. In contrast, TS approaches the heme with the A ring ( $\beta$ -side) of the steroid nucleus and undergoes oxidation primarily at C6 $\beta$  and C2 $\beta$  [36] and at the minor C1 $\beta$  and C11 $\beta$  sites [37,38], all of which are too far from the catalytic center in the crystal structure.

The main difference between *cis-10* and other dimer analogues is in the length and/or stereo configuration of the aliphatic linker, defining the relative positioning of sterol rings. Taking into account the big spread in  $K_d$  and  $IC_{50}$  (Table 4.2) and the crystallographic binding mode of *cis-10* (Figure 4.7), it is evident that both stereochemistry of the 17-OH and 3-C=O groups and spatial orientation of the distal sterol are important for the binding and inhibition of CYP3A4. The 17-OH and 3-C=O functionalities establish polar interactions that anchor the dimer to the active site, whereas the distal sterol could control the overall conformation and the access to the active site. As this study demonstrates, one way to modulate the inhibitory strength is to vary the linker length, which in turn, alters the dimer binding manner. Thus, the CYP3A4-*cis-10* complex provides the first insights on how monomeric and dimeric sterols can be oriented in the active site, supports the current and previous experimental findings, and helps better understand the underlying mechanism for the dimers' inhibitory action.

## 4.7 Conclusion

In this study, we prepared and characterized several androgen-based dimers designed for the treatment of PCa. The new molecules were tested on both AR+ and AR- PCa cells. It was discovered that the dimer made of the natural hormone TS, compound **14 $\beta$** , was ~5 times more active than the antiandrogen drug CPA and, along with the 17-OH stereoisomer **14 $\alpha$** , could completely inhibit TS or DHT stimulated LNCaP PCa cell growth at low concentrations. Both **14 $\alpha$**  and **14 $\beta$**  could also bind and inhibit CYP3A4, the major androgen-metabolizing enzyme. Thus, further tests will be necessary to assess the potential impact of cross-reactivity with CYP3A4 and possible utilization of **14 $\alpha$**  and **14 $\beta$**  as “natural antiandrogens” for PCa treatment.

## 5. Experimental protocols

### 5.1 Biological Methods

The antiproliferative activity of all compounds was assessed using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT) assay [27,28]. LNCaP androgen-sensitive human prostate adenocarcinoma, PC3 androgen-insensitive human prostate adenocarcinoma and DU145 androgen-insensitive human prostate adenocarcinoma cells were purchased from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). LNCaP and PC3 were cultured in RPMI medium (Hyclone, Logan, UT) supplemented with 10% of calf serum and Penicillin-Streptomycin-Glutamine. The cells were maintained at 37 °C in a moisture saturated atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>.

### 5.1.1 Antiproliferative activity assay

Cell viability of compounds **13**, **13 $\alpha$** , **13 $\beta$** , **14**, **14 $\alpha$** , **14 $\beta$** , **15** and CPA was determined by the MTT assay [99,100]. Briefly,  $8 \times 10^3$  cells/well were seeded into 96-well plate and incubated overnight. After culturing for 48 h in fresh medium containing various concentrations of TS dimers, the cells were stained with MTT solution (0.5 mg/mL; Sigma-Aldrich) for 3 h at cell culture condition followed by dissolving with 10% Triton-X 100 in acidic isopropanol (0.1N HCl). The cell growth was determined by measuring optical density (OD) value at 590 nm using the Synergy HT Microplate Reader (from Bio-Tek). Readings obtained from treated cells were compared with measurements of control cells plates fixed on the treatment day, and the percentage of cell growth inhibition was then calculated for each compound. Each condition included three replicate wells with three independent repeats.

### 5.1.2 Inhibition of testosterone- and dihydrotestosterone-induced cell proliferation of LNCaP PCa cells by dimers 14 $\beta$ and 14 $\alpha$ .

LNCaP cells were seeded at  $8 \times 10^3$  cells/well into 96 well plates in medium as above supplemented with 10% FBS. After incubation for 48 h, the cells of the control group were treated with vehicle (DMSO, 0.1% in culture media), whereas the TS and DHT groups were treated at a concentration of 0.1 nM. The combination groups were also treated with 0.1 nM TS or DHT along with different concentrations of the dimers **14 $\alpha$**  and **14 $\beta$**  (0.125, 0.25, 0.5 and 1  $\mu$ M). After 48 hours, the OD of the wells at 590 nm was measured using a microplate reader after incubation with MTT solution at 37 °C for 3 h as described above. Each condition included three replicate wells with three independent repeats.

## 5.2 Spectral and structural studies on CYP3A4

Codon-optimized full-length and  $\Delta$ 3-22 human CYP3A4 were produced as reported previously [39] and used for assays and crystallization, respectively. Equilibrium ligand binding to CYP3A4 was monitored in a Cary 300 spectrophotometer at ambient temperature in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, supplemented with 20% glycerol and 1 mM dithiothreitol. Sterol dimers were dissolved in DMSO and added to a 2  $\mu$ M protein solution in small aliquots, with the final solvent concentration <2%. Spectral dissociation constant ( $K_d$ ) was determined from hyperbolic or quadratic fits to titration plots. Inhibitory potency of sterol dimers for the BFC debenzoylation activity of CYP3A4 was measured in a soluble reconstituted system as described in detail elsewhere [40]. CYP3A4 bound to *cis*-**10** was crystallized using a sitting drop vapor diffusion method. Prior to crystallization setup, CYP3A4 (60 mg/mL in 50 mM phosphate, pH 7.4) was incubated with a 5-fold excess of *cis*-**10** and centrifuged to remove the precipitate. The supernatant (0.5  $\mu$ L) was mixed with 0.4  $\mu$ L of crystallization solution containing 10% polyethylene glycol 3350 and 80 mM sodium malonate, pH 7.0. Crystals were grown at room temperature within 2 days and cryoprotected with Paratone-N before freezing in liquid nitrogen. X-ray diffraction data were collected at the Stanford Synchrotron Radiation Lightsource beamline 12-2. Crystal structure was solved by molecular replacement with PHASER [41] and 5VCC as a search model. The ligand was built with eLBOW [42] and manually fit into the density with COOT [43]. The initial model was rebuilt and refined with COOT and PHENIX. Polder omit electron density map was calculated with PHENIX. Data collection and refinement statistics are summarized in Table S1. The atomic coordinates and structure factors for the *cis*-**10**-CYP3A4 complex were deposited in the Protein Data Bank with the ID code 7LXL.

### 5.3 Chemistry

Anhydrous reactions were performed under an inert atmosphere of nitrogen. The starting material, reactant and solvents were obtained commercially and used as such or purified and dried by standard means [44]. Organic solutions were dried over magnesium sulfate ( $\text{MgSO}_4$ ), filtered and evaporated on a rotary evaporator under reduced pressure. All reactions were monitored by UV fluorescence. Commercial TLC plates were Sigma T 6145 (polyester silica gel 60Å, 0.25 mm). Flash column chromatography was performed according to the method of Still et al. on Merck grade 60 silica gel, 230-400 mesh [45]. All solvents used in chromatography were distilled prior to use.

The infrared spectra were taken on a Nicolet Impact 420 FT-IR spectrophotometer. Mass spectral assays were obtained using a MS model 6210, Agilent technology instrument. The high resolution mass spectra (HRMS) were obtained by TOF (time of flight) using ESI (electrospray ionization) using the positive mode (ESI+) (Université du Québec à Montréal and at Université Laval). Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded on a Varian 200 MHz NMR apparatus. Samples were dissolved in deuterated chloroform ( $\text{CDCl}_3$ ) for data acquisition using the residual solvent signal as internal standard (chloroform  $\delta$  7.26 ppm for  $^1\text{H}$  NMR and  $\delta$  77.23 ppm for  $^{13}\text{C}$  NMR). Chemical shifts ( $\delta$ ) are expressed in parts per million (ppm), the coupling constants (J) are expressed in hertz (Hz). Multiplicities are described by the following abbreviations: s for singlet, d for doublet, t for triplet and m for multiplet, and bs for broad singlet.

Note: The nomenclature of the TS derivatives described herein was based on the androgen skeleton (4-androsten-17 $\beta$ -ol-3-one) for clarity to the readers and to simplify the visualization of the molecules prepared in this manuscript.

### 5.3.1 Synthesis of testosterone and androstenedione dimers

#### 5.3.1.1 Preparation of 7 $\alpha$ -(buta-1,3-dienyl)-4-androsten-17 $\beta$ -ol-3-one (**13 $\beta$** )

The precursor steroid 7 $\alpha$ -(4-chloro-but-2-enyl)-4-androsten-17 $\beta$ -ol-3-one (**12**) (109 mg, 0.29 mmol) was dissolved in acetonitrile (3 mL) under a nitrogen atmosphere. To this solution was added cesium carbonate (375 mg, 1.15 mmol) and the ruthenium catalyst Ru(Cp\*)(MeCN)<sub>3</sub> [PF<sub>6</sub>] (10.2 mg, 7% mol). The resulting mixture was stirred vigorously for two days at room temperature and in the dark (the reaction vessel was wrapped with aluminum paper). Afterwards, the reaction mixture was diluted with ether (100 mL), transferred into a separatory funnel and washed three times with water (3 x 75 mL). The organic phase was dried with anhydrous magnesium sulfate, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude material was purified by flash chromatography (hexane/acetone, 9/1) to give 64.3 mg (66%) of the desired material. mp: 99 - 101°C; IR  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3420 (O-H), 1651 (C=O), 1614 (C=C), 1238 (C-O); <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 6.32 – 6.02 (2H, m, 21-CH and 22-CH), 5.72 (1H, s, 4-CH), 5.67 – 5.55 (1H, m, 20-CH) 5.17 – 5.00 (2H, m, 23-CH<sub>2</sub>), 3.62 (1H, t, J=8.6 Hz, 17-CH), 1.23 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 0.79 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 199.1 (C-3), 169.0 (C-5), 137.0 (C-20), 133.0 (C-22), 132.9 (C-21), 125.8 (C-4), 116.2 (C-23), 81.3 (C-17), 52.5, 47.1, 42.9, 41.1, 39.3, 39.0, 38.8, 36.0, 35.9, 34.0, 30.3, 22.7, 20.6, 17.8, 11.0; HRMS (ESI<sup>+</sup>): (M+H)<sup>+</sup> calculated for C<sub>23</sub>H<sub>33</sub>O<sub>2</sub> = 341.2475; found = 341.2475.

### 5.3.1.2 Preparation of 7 $\alpha$ -(buta-1,3-dienyl)-4-androsten-17 $\beta$ -ol-3-one (**13 $\beta$** ) and 7 $\alpha$ -(buta-1,3-dienyl)-4-androsten-17 $\alpha$ -ol-3-one (**13 $\alpha$** )

As described above, the precursor steroid 7 $\alpha$ -(4-chloro-but-2-enyl)-4-androsten-17 $\beta$ -ol-3-one (**12**) (499 mg, 1.32 mmol) was dissolved in acetonitrile (15 mL) under a nitrogen atmosphere. To this solution was added cesium (1.73 g, 5.29 mmol) and the ruthenium catalyst Ru(Cp\*)(MeCN)<sub>3</sub> [PF<sub>6</sub>] (47 mg, 7% mol). The resulting mixture was stirred vigorously for two days at room temperature and in the dark (the reaction vessel was wrapped with aluminum paper). Afterwards, the reaction mixture was diluted with ether (500 mL), transferred into a separatory funnel and washed three times with water (3 x 375 mL). The organic phase was dried with anhydrous magnesium sulfate, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude material was purified by flash chromatography (hexane/acetone, 9/1) to give 78.1 mg of **13 $\beta$**  (17%) along with 78.8 mg (18%) of the 17 $\alpha$ -hydroxy isomer (**13 $\alpha$** ). It is noteworthy to indicate that the latter product was usually not observed with this reaction. The epimerization of the hydroxyl function occurred only when a newly purchased ruthenium catalyst was used (lot #MKCK1977). 17 $\beta$ -hydroxy isomer **13 $\beta$** : see section 4.2.1.1 for spectral data. 17 $\alpha$ -hydroxy isomer **13 $\alpha$** : mp: 129 - 131°C; IR  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3428 (O-H), 1660 (C=O), 1614 (C=C), 1225 (C-O). <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 6.36 – 6.03 (2H, m, 21-CH and 22-CH), 5.72 (1H, s, 4-CH), 5.68 – 5.60 (1H, m, 20-CH) 5.14 – 4.97 (2H, m, 23-CH<sub>2</sub>), 3.73 (1H, d, J=5.9 Hz, 17-CH), 1.23 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 0.70 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 199.1 (C-3), 169.2 (C-5), 137.2 (C-20), 133.1 (C-22), 132.9 (C-21), 125.7 (C-4), 116.0 (C-23), 79.5 (C-17), 46.9, 45.3, 45.1, 41.8, 39.4, 39.3, 38.7, 35.9, 34.0, 32.4, 30.9, 24.0, 20.6, 17.8, 16.9; HRMS (ESI<sup>+</sup>): (M+H)<sup>+</sup> calculated for C<sub>23</sub>H<sub>33</sub>O<sub>2</sub> = 341.2475; found = 341.2472.



### 5.3.1.3 Preparation of 7 $\alpha$ -(buta-1,3-dienyl)-4-androsten-3,17-dione (**13**)

The steroid 7 $\alpha$ -(buta-1,3-dienyl)-4-androsten-17 $\beta$ -ol-3-one (**13 $\alpha/\beta$** ) (18 mg, 0.05 mmol) was dissolved in methylene chloride (1 mL) and treated with pyridinium chlorochromate on alumina (33.8 mg, 0.16 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 2.5 h. Afterwards, the reaction mixture was filtered on silica gel with methylene chloride as the eluent (30 mL). The organic phase was dried, filtered and evaporated to a brownish solid. The crude material was purified by flash chromatography (hexane/acetone, 9/1) to give 11.4 mg (65%) of the oxidized product **13**. mp: Decomposition begins at 163°C; IR  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 1734 (C=O), 1664 (C=O enone), 1615 (C=C); <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 6.31 – 6.08 (2H, m, 21-CH and 22-CH), 5.75 (1H, s, 4-CH), 5.74 – 5.64 (1H, m, 20-CH) 5.18 – 5.01 (2H, m, 23-CH<sub>2</sub>), 1.24 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 0.91 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 220.0 (C-17), 198.9 (C-3), 168.1 (C-5), 136.7 (C-20), 133.4 (C-22), 132.2 (C-21), 126.0 (C-4), 116.7 (C-23), 47.6, 47.5, 47.1, 40.6, 39.3, 38.7, 38.5, 35.9, 35.5, 34.0, 30.9, 21.2, 20.3, 17.7, 13.7; HRMS (ESI<sup>+</sup>): (M+H)<sup>+</sup> calculated for C<sub>23</sub>H<sub>31</sub>O<sub>2</sub> = 339.2319; found = 339.2318.

#### 5.3.1.4 Preparation of trans,trans,trans-1,6-bis-(17 $\beta$ -hydroxy-4-androsten-3-one-7 $\alpha$ -yl)hexatriene (**14 $\beta$** )

The steroid 7 $\alpha$ -(buta-1,3-dienyl)-4-androsten-17 $\beta$ -ol-3-one (**13 $\beta$** ) (23.0 mg, 0.07 mmol) was dissolved in methylene chloride (0.5 mL). Under an inert atmosphere of nitrogen, a solution of 2<sup>nd</sup> generation Hoveyda-Grubbs catalyst (5.7 mg, 10% mol) in methylene chloride (0.5 mL) was added to the reaction mixture. The solution was stirred for 48 h in the dark. The nitrogen atmosphere was constantly purged during the first two hours of the reaction, and if evaporation occurs the loss of the solvent was maintained throughout the reaction. Then, the reaction flask was regularly purged with nitrogen during the remaining course of the reaction. Afterwards, the solvent was evaporated and the crude material immediately purified by flash chromatography (hexane/acetone, 70/30) to give 13.9 mg (63%) of the desired TS dimer **14 $\beta$** . mp: Decomposition begins at 189°C; IR  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3423 (O-H), 1662 (C=O), 1615 (C=C), 1234 (C-O); <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 6.15 – 6.06 (4H, m, 21-CH and 22-CH), 5.71 (2H, s, 4-CH), 5.74 – 5.61 (2H, m, 20-CH), 3.70 – 3.55 (2H, m, 17-CH), 1.25 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 0.78 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 199.1 (C-3), 169.4 (C-5), 132.9 (C-20), 132.2 (C-21), 131.6 (C-22), 125.8 (C-4), 81.3 (C-17), 47.2, 47.0, 46.9, 42.9, 41.2, 39.5, 39.2, 38.8, 35.9, 34.0, 30.3, 22.8, 20.6, 17.8, 11.0; HRMS (ESI<sup>+</sup>): (M+H)<sup>+</sup> calculated for C<sub>44</sub>H<sub>61</sub>O<sub>4</sub> = 653.4564; found = 653.4561.

### 5.3.1.5 Preparation of trans,trans,trans-1,6-bis-(17 $\alpha$ -hydroxy-4-androsten-3-one-7 $\alpha$ -yl)hexatriene (**14 $\alpha$** )

Following the procedure described for the preparation of dimer **14 $\beta$**  using 7 $\alpha$ -(buta-1,3-dienyl)-4-androsten-17 $\alpha$ -ol-3-one (**13 $\alpha$** ) (22.4 mg, 0.07 mmol) instead of its 17 $\beta$ -hydroxy epimer (**13 $\beta$** ) the titled dimer was obtained with 34% yield (7.2 mg). Purification of the crude material by flash chromatography using a mixture of hexane/acetone, 7/3 gave the desired dimer **14 $\alpha$** . mp: Decomposition begins at 163.8°C; IR  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3432 (O-H), 1660 (C=O), 1615 (C=C), 1235 (C-O); <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 6.11 – 6.06 (4H, m, 21-CH and 22-CH), 5.71 (2H, s, 4-CH), 5.71 – 5.57 (2H, m, 20-CH), 3.72 (2H, d, J=5,9 Hz, 17-CH), 1.25 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 0.70 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 199.1 (C-3), 169.2 (C-5), 132.6 (C-20), 132.2 (C-21), 131.7 (C-22), 125.7 (C-4), 79.5 (C-17), 53.8, 47.0, 45.3, 43.2, 42.2, 39.6, 39.4, 38.7, 35.9, 34.0, 30.9, 23.9, 20.6, 17.8, 16.9; HRMS (ESI<sup>+</sup>): (M+H)<sup>+</sup> calculated for C<sub>44</sub>H<sub>61</sub>O<sub>4</sub> = 653.4564; found = 653.4562.

### 5.3.1.6 Preparation of trans,trans,trans-1,6-bis-(4-androsten-3,17-dione-7 $\alpha$ -yl)hexatriene (**14**)

Following the procedure described for the preparation of dimer **14 $\beta$**  using the oxidized derivative 7 $\alpha$ -(buta-1,3-dienyl)-4-androsten-3,17-dione (**13**) (41.5 mg, 0.12 mmol) the titled dimer **14** was obtained with 77% yield (30.8 mg). This dimer was purified by flash chromatography using a mixture of hexane/acetone, 7/3. mp: Decomposition begins at 175°C; IR  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 1734 (C=O), 1663 (C=O enone), 1614 (C=C); <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 6.15 – 6.09 (4H, m, 21-CH and 22-CH), 5.73 (2H, s, 4-CH), 5.78 – 5.63 (2H, m, 20-CH), 1.25 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 0.91 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 219.9 (C-17), 198.8 (C-3), 168.1 (C-5), 132.5 (C-20), 132.3 (C-21), 131.7 (C-22), 126.0 (C-4), 47.6, 47.5, 47.1, 40.7, 39.4, 38.8, 38.6, 35.9, 35.5, 34.0, 30.9, 21.3, 20.3, 17.7, 13.7; HRMS (ESI<sup>+</sup>): (M+H)<sup>+</sup> calculated for C<sub>44</sub>H<sub>57</sub>O<sub>4</sub> = 649.4251; found = 649.4253.

### 5.3.1.7 Preparation of 4-(17 $\beta$ -hydroxy-4-androsten-3-one-7 $\alpha$ -yl)-3a,4,7,7a-tetrahydroisobenzofuran-1,3-dione (**15**)

The steroid derivative 7 $\alpha$ -(buta-1,3-dienyl)-4-androsten-17 $\beta$ -ol-3-one (**13 $\beta$** ) (22.3 mg, 0.06 mmol) was dissolved in toluene (0.5 mL) and maleic anhydride was added (31.6 mg, 0.32 mmol). The solution was stirred at reflux for three hours. Afterwards, the reaction mixture was cooled down and evaporated under reduced pressure. The crude material was purified by flash chromatography (hexane/acetone 7/3) to give 5.2 mg of pure Diels-Alder adduct **15** with 19% yield. mp: 152 - 154°C; IR (cm<sup>-1</sup>): 3415 (O-H), 1845 and 1771 (C=O, anhydride), 1663 (C=O), 1613 (C=C), 1242 (C-O); <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 6.03 (2H, br s, 20-CH and 21-CH), 5.77 (1H, s, 4-CH), 3.65 – 3.50 (2H, m, 17-CH and 25-CH), 3.39 (1H, t, J=7.8 Hz, 22-CH), 1.30 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 0.81 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 198.7 (C-3), 173.9 (C-23), 172.0 (C-24), 169.8 (C-5), 134.0 (C-21), 128.1 (C-20), 125.6 (C-4), 81.0 (C-17), 46.0, 45.3, 43.4, 42.0, 41.4, 40.9, 39.0, 38.2, 36.1, 35.7, 35.5, 34.5, 34.1, 30.0, 25.2, 24.6, 20.6, 19.0 10.8; HRMS (ESI<sup>+</sup>): (M+H)<sup>+</sup> calculated for C<sub>27</sub>H<sub>35</sub>O<sub>5</sub> = 439.2479; found = 439.2477.

## 4.8 Acknowledgments

The authors thank the Cancer Research Society (CRS: number 22471) and the Canadian Institutes of Health Research for financial support (CIHR; number 392334). This work was also sponsored by a grant from Aligo Innovation (number 150923), the “Ministère de l’Économie et de l’Innovation”, Québec government to C. Reyes-Moreno and G. Bérubé, and by the National Institutes of Health Grant ES025767 to I. F. Sevrioukova.

#### 4.9 References

- [1] K.C. Nicolaou, T. Montagnon, *Molecules that Changed the World: A Brief History of the Art and Science of Synthesis and its Impact on Society*, Wiley-VCH, Weinheim, 2008.
- [2] A. Rana, J.M. Alex, M. Chauhan, G. Joshi, R. Kumar, A review on pharmacophoric designs of antiproliferative agents, *Med. Chem. Res.* 24 (2015) 903e920.
- [3] K. Nepali, S. Sharma, M. Sharma, P.M.S. Bedi, K.L. Dhar, Rational approaches, design strategies, structure activity relationship and mechanistic insights for anticancer hybrids, *Eur. J. Med. Chem.* 77 (2014) 422e487.
- [4] Shaveta, S. Mishra, P. Singh, Hybrid molecules: the privileged scaffolds for various pharmaceuticals, *Eur. J. Med. Chem.* 124 (2016) 500e536.
- [5] G. Bérubé, An overview of molecular hybrids in drug discovery, *Expert Opin.-Drug Discov.* 11 (2016) 281e305.
- [6] G. Bérubé, Natural and synthetic biologically active dimeric molecules: anticancer agents, anti-HIV agents, steroid derivatives and opioid antagonists, *Curr. Med. Chem.* 13 (2006) 131e154.
- [7] S. Choudhary, P.K. Singh, H. Verma, H. Singh, O. Silakari, Success stories of natural product-based hybrid molecules for multifactorial diseases, *Eur. J. Med. Chem.* 151 (2018) 82e97.
- [8] L. Naha, S.D. Sarker, *Steroid Dimers: Chemistry and Applications in Drug Design and Delivery*, first ed., 2012, p. 440. West Sussex, United Kingdom.
- [9] K. Sumoto, Synthetic studies on developments for bioactive new leads of oligovalent symmetrical molecules, *Yakugaku Zasshi* 140 (2020) 529e541.
- [10] M. Nadal, S. Prekovic, N. Gallastegui, C. Helsen, M. Abella, K. Zielinska, M. Gay, M. Vilaseca, M. Taulées, A.B. Houtsmuller, M.E. van Royen, F. Claessens, P. Fuentes-Prior, E. Estébanez-Perpiñá, Structure of the homodimeric androgen receptor ligand-binding domain, *Nat. Commun.* 8 (2017) 14388.
- [11] D. Bastien, V. Leblanc, E. Asselin, G. Bérubé, First synthesis of separable isomeric testosterone dimers showing differential activities on prostate cancer cells, *Bioorg. Med. Chem. Lett* 20 (2010) 2078e2081.
- [12] I.G. Denisov, P.J. Mak, Y.V. Grinkova, D. Bastien, G. Bérubé, S.G. Sligar, J.R. Kincaid, The use of isomeric testosterone dimers to explore allosteric effects in substrate binding to cytochrome P450 CYP3A4, *J. Inorg. Biochem.* 158 (2016) 77e85.
- [13] J.S. Millership, M.L. Shanks, Prodrugs utilizing organosilyl derivation: an investigation of the long-term androgenic and myotrophic activities of silyl derivatives of testosterone, *J. Pharmaceut. Sci.* 77 (1988) 116e119.
- [14] Lutfun Nahara, Satyajit D. Sarkerb, Alan B. Turnera, Synthesis of 17 $\beta$ -hydroxy steroidal oxalate dimers from naturally occurring steroids, *Acta Chim. Slov.* 54 (2007) 903e906.

- [15] A.-R. Vesper, J. Lacroix, R.C. Gaudreault, H.-A. Tajmir-Rihai, G. Bérubé, Synthesis of novel C2-symmetric testosterone dimers and evaluation of antiproliferative activity on androgen-dependent and -independent prostate cancer cell lines, *Steroids* 115 (2016) 98e104.
- [16] N.M. Krstić, M.S. Bjelaković, M.M. Dabović, V.D. Pavlović, Thionation of some  $\alpha,\beta$ -unsaturated steroidal ketones, *Molecules* 15 (2010) 3462e3477.
- [17] N.M. Krstić, I.Z. Mati, Z.D. Juranić, I.T. Novaković, D.M. Sladić, Steroid Dimers- In vitro cytotoxic and antimicrobial activities, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 143 (2014) 365e375.
- [18] D.R. Brenner, H.K. Weir, A.A. Demers, L.F. Ellison, C. Louzado, A. Shaw, D. Turner, R.R. Woods, L.M. Smith, Projected estimates of cancer in Canada in 2020, *CMAJ (Can. Med. Assoc. J.)* 192 (2020) E199eE205.
- [19] C.A. Heinlein, C. Chang, Androgen receptor in prostate cancer, *Endocr. Rev.* 25 (2004) 276e308.
- [20] D. Bastien, R. Hanna, V. Leblanc, E. Asselin, G. Bérubé, Synthesis and preliminary in vitro biological evaluation of 7 $\alpha$ -testosterone-chlorambucil hybrid designed for the treatment of prostate cancer, *Eur. J. Med. Chem.* 64 (2013) 442e447.
- [21] H.J. Zhang, B. Demerseman, Z. Xi, C. Bruneau, Ruthenium catalysts for controlled mono-and bis-allylation of active methylene compounds with aliphatic allylic substrates, *Adv. Synth. Catal.* 351 (2009) 2724e2728.
- [22] P. Dionne, B.T. Ngatcha, D. Poirier, D-ring allyl derivatives of 17 $\beta$ - and 17 $\alpha$ -estradiols: chemical synthesis and <sup>13</sup>C NMR data, *Steroids* 62 (1997) 674e681.
- [23] Y.-S. Cheng, W.-L. Liu, S. Chen, Pyridinium chlorochromate adsorbed on alumina as a selective oxidant for primary and secondary alcohols, *Synthesis* 3 (1980) 223e224.
- [24] S.J. Connon, S. Blechert, Recent developments in olefin cross-metathesis, *Angew. Chem. Int. Ed.* 42 (2003) 1900e1923.
- [25] N.K. Yee, V. Farina, Efficient large-scale synthesis of BILN 2061, a potent HCV protease inhibitor, by a convergent approach based on ring-closing metathesis, *J. Org. Chem.* 71 (2006) 7133e7145.
- [26] G. Deslongchamps, P. Deslongchamps, Bent bonds and the antiperiplanar hypothesis as a simple model to predict Diels-Alder reactivity: retrospective or perspective? *Tetrahedron* 69 (2013) 6022e6033.
- [27] J. Carmichael, W.G. DeGraff, A.F. Gazdar, J.D. Minna, J.B. Mitchell, Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing, *Canc. Res.* 47 (1987) 936e942.
- [28] C.H.J. Ford, V.J. Richardson, G. Tsaltas, Comparison of tetrazolium colorimetric and [<sup>3</sup>H]-uridine assays for in vitro chemosensitivity testing, *Canc. Chemother. Pharmacol.* 24 (1989) 295e301.
- [29] R.M. Phillips, M.C. Bibby, J.A. Double, P.M. Loadman, The relationship between the *in vitro* chemosensitivity of tumor cells and tumor response in vivo in an experimental tumor model, *Int. J. Cell Clon.* 9 (1991) 144e154.

- [30] R.M. Phillips, M.C. Bibby, J.A. Double, A critical appraisal of the predictive value of in vitro chemosensitivity assays, *J. Natl. Cancer Inst.* 82 (1990) 1457e1468.
- [31] D.J. Waxman, C. Attisano, F.P. Guengerich, D.P. Lapenson, Cytochrome P-450 steroid hormone metabolism catalyzed by human liver microsomes, *Arch. Biochem. Biophys.* 263 (1988) 424e436.
- [32] Q. Cheng, C.D. Sohl, F.K. Yoshimoto, F.P. Guengerich, Oxidation of dihydrotestosterone by human cytochromes P450 19A1 and 3A4, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 29554e29567.
- [33] I.G. Denisov, B.J. Baas, Y.V. Grinkova, S.G. Sligar, Cooperativity in cytochrome P450 3A4: linkages in substrate binding, spin state, uncoupling, and product formation, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 7066e7076.
- [34] N. Finnström, C. Bjelfman, T.G. Söderström, G. Smith, L. Egevad, B.J. Norlén, C.R. Wolf, A. Rane, Detection of cytochrome P450 mRNA transcripts in prostate samples by RT-PCR, *Eur. J. Clin. Invest.* 31 (2001) 880e886.
- [35] T. Fujimura, S. Takahashi, T. Urano, J. Kumagai, T. Murata, K. Takayama, T. Ogushi, K. Horie-Inoue, Y. Ouchi, T. Kitamura, M. Muramatsu, Y. Homma, S. Inoue, Expression of cytochrome P450 3A4 and its clinical significance in human prostate cancer, *Urology* 74 (2009) 391e397.
- [36] S.E. Kandel, L.W. Han, Q. Mao, J.N. Lampe, Digging deeper into CYP3A testosterone metabolism: kinetic, regioselectivity, and stereoselectivity differences between CYP3A4/5 and CYP3A7, *Drug Metabol. Dispos.* 45 (2017) 1266e1275.
- [37] J.A. Krauser, M. Voehler, L.H. Tseng, A.B. Schefer, M. Godejohann, F.P. Guengerich, Testosterone 1 $\beta$ -hydroxylation by human cytochrome P450 3A4, *Eur. J. Biochem.* 271 (2004) 3962e3969.
- [38] M.H. Choi, P.L. Skipper, J.S. Wishnok, S.R. Tannenbaum, Characterization of testosterone 11 $\beta$ -hydroxylation catalyzed by human liver microsomal cytochromes P450, *Drug Metab. Dispos.* 33 (2005) 714e718.
- [39] I.F. Sevrioukova, High-level production and properties of the cysteine-depleted cytochrome P450 3A4, *Biochemistry* 56 (2017) 3058e3067.
- [40] E.R. Samuels, I.F. Sevrioukova, Rational design of CYP3A4 inhibitors: a oneatom linker elongation in ritonavir-like compounds leads to a marked improvement in the binding strength, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 8520.
- [41] A.J. McCoy, R.W. Grosse-Kunstleve, P.D. Adams, M.D. Winn, L.C. Storoni, R.J. Read, Phaser crystallographic software, *J. Appl. Crystallogr.* 40 (2007) 658e674.
- [42] P.D. Adams, P.V. Afonine, G. Bunk-oczi, V.B. Chen, I.W. Davis, N. Echols, J.J. Headd, L.W. Hung, G.J. Kapral, R.W. Grosse-Kunstleve, A.J. McCoy, N.W. Moriarty, R. Oeffner, R.J. Read, D.C. Richardson, J.S. Richardson, T.C. Terwilliger, P.H. Zwart, PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66 (2010) 213e221.
- [43] P. Emsley, B. Lohkamp, W.G. Scott, K. Cowtan, Features and development of coot, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66 (2010) 486e501.



- [44] W.L.F. Armarego, *Purification of Laboratory Chemicals*, Eight Edition, Butterworth Heinemann, Oxford, 2017, ISBN 9780128054574, p. 1198.
- [45] W.C. Still, M. Kahn, A. Mitra, Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution, *J. Org. Chem.* 43 (1978) 2923e2925.

## CHAPITRE V

### RÉSULTATS - PARTIE II

Ce chapitre présente les diverses étapes de synthèse des dimères d'androgènes fonctionnalisés en  $17\alpha$  et discute des résultats obtenus concernant l'activité biologique et l'interaction avec le cytochrome P450 3A4.

#### 5.1 Synthèse des dimères de la testostérone fonctionnalisés en $17\alpha$

##### 5.1.1 Protection et oxydation de la testostérone

Les premières étapes de la synthèse des dimères sont la protection et l'oxydation de la testostérone (Figure 5.1).

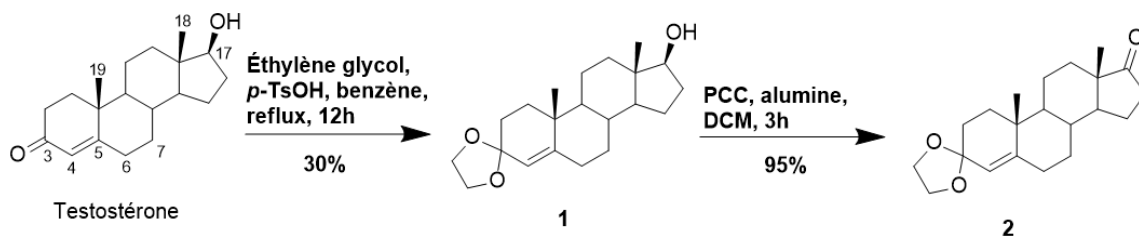


Schéma 5.1 Protection et oxydation de la testostérone.

L'énone de la testostérone fut d'abord protégée sous forme de cétal à l'aide d'un traitement à l'éthylène glycol en condition acide. L'énone est protégée afin d'éviter qu'elle ne réagisse avec un réactif organométallique qui sera employé plus tard dans la

synthèse. Le groupement cétal fut choisi comme groupement protecteur pour la facilité avec laquelle il peut être préparé et enlevé. Ce groupement est également capable de tolérer des conditions oxydantes nécessaires pour obtenir le composé **2**. Le composé **1** est obtenu avec un rendement de 43%. Le rendement obtenu est supérieur au rendement littéraire de 30% [101].

L'hydroxyle sur le carbone 17 du composé protégé **1** peut maintenant être oxydé en cétone. L'oxydation fut réalisée avec un mélange de chlorochromate de pyridinium (PCC) et d'alumine. Le PCC est un oxydant à base de chrome VI très efficace pour l'oxydation des alcools. Il est aussi connu que le PCC peut oxyder les alcools sans affecter la fonction cétal, ce qui motive également le choix de cet agent oxydant dans la voie de synthèse [102]. L'alumine a ici une double fonction : elle sert à tamponner le milieu afin d'éviter que ce dernier ne devienne trop acide et elle sert de support solide qui permet l'adsorption des composés présents en solution, facilitant ainsi la récupération de ces derniers. Après la réaction, le produit brut est récupéré après une simple filtration sur gel de silice et possède une excellente pureté. Un rendement de 95% est observé pour cette réaction. Le produit **2** porte le nom d'androst-4-èn-17-one spiro-(1,3)dioxolane.

#### 5.1.2 Addition d'un réactif organométallique sur l'androst-4-èn-17-one spiro-(1,3)dioxolane et déprotection

L'addition d'un réactif organométallique approprié sur la cétone **2** va se faire stéréospécifiquement en  $17\alpha$  compte tenu de l'encombrement stérique de la face  $\beta$  du stéroïde, particulièrement causé par la présence du méthyle angulaire 18. Une série d' $\omega$ -halogénoalcènes fut sélectionnée pour donner un produit d'addition porteur d'un alcène terminal nécessaire à la réaction de métathèse d'oléfines menant aux dimères cibles.

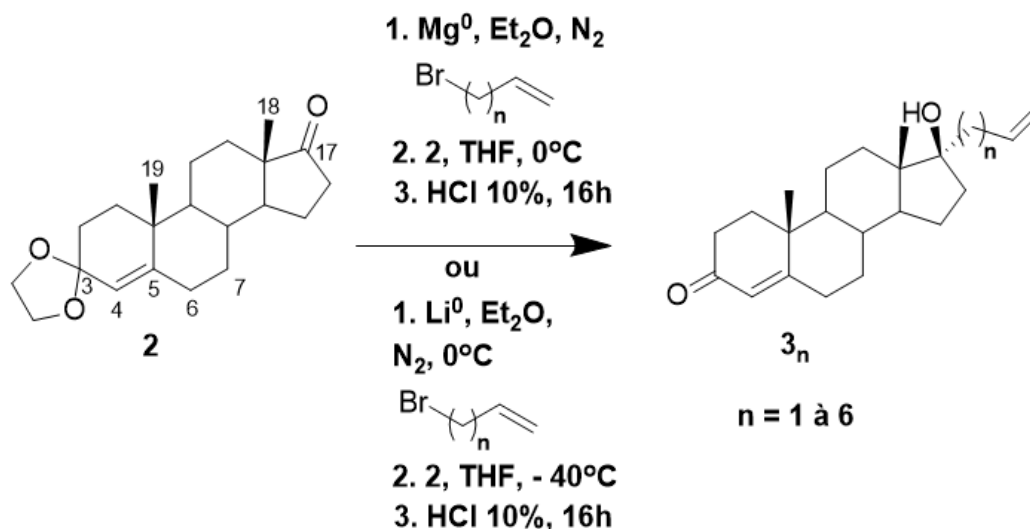


Schéma 5.2 Addition d'un organométallique et déprotection de l'androst-4-èn-17-one spiro-(1,3)dioxolane.

La Figure 5.2 illustre les deux conditions réactionnelles qui ont été employées pour transformer le composé **2** en précurseurs **3<sub>n</sub>**. L'une des deux voies utilise un réactif de Grignard alors que l'autre utilise un organolithien.

Pour la première voie de synthèse, le réactif de Grignard est formé en mélangeant du magnésium métallique avec un bromoalcène dans l'éther diéthylique. Dans ces conditions, le magnésium métallique peut réaliser une addition oxydante dans le lien brome-carbone du bromoalcène, inversant ainsi la polarité de ce lien, générant une charge partielle négative sur le carbone [103]. La solution est gardée sous atmosphère inerte afin d'éviter que de l'eau ou de l'humidité ne soit introduit dans le mélange réactionnel, ce qui pourrait nuire au bon déroulement de la réaction puisque l'eau peut détruire le réactif de Grignard. La réaction est réalisée dans l'éther diéthylique, car les paires d'électrons libres sur l'oxygène de l'éther aident à solubiliser l'organomagnésien. Une fois ce dernier formé, il peut être ajouté goutte à goutte à une solution du composé **2** dissous dans le THF. L'ajout goutte à goutte est réalisé afin de ne pas provoquer une élévation trop brusque de la température du milieu réactionnel.

Une fois le réactif de Grignard ajouté au composé **2**, l'addition au carbonyle est instantanée, générant ainsi l'alcoxyde de bromure de magnésium. L'attaque est stéréosélective, car la stéréochimie du groupement méthyle situé sur le carbone 18 entraîne de l'encombrement stérique sur la face bêta du stéroïde. Une attaque nucléophile sur le carbone 17 se fait nécessairement de la face alpha. Une fois l'addition réalisée, l'alcoxyde de bromure de magnésium sera par la suite hydrolysé par un traitement acide. En laissant le produit d'addition dans une solution acide toute la nuit, on arrive aussi à déprotéger le groupement cétal pour régénérer l'énone sur le carbone 3. On forme ainsi les produits **3<sub>1-6</sub>**.

<b>Rendements des réactions de Grignard</b>	
Bromoalcène employé	Rendement (%)
Bromure d'allyle	74
4-bromo-1-butène	6
5-bromo-1-pentène	6
6-bromo-1-hexène	10
7-bromo-1-heptène	11
8-bromo-1-octène	6

Tableau 5.1 Rendements des réactions de Grignard exécutées avec divers bromoalcènes.

Le produit d'addition **3<sub>1</sub>** fut formé avec un rendement de 74% alors que les produits **3<sub>2-6</sub>** furent synthétisés avec des rendements variant entre 6% et 11% (Tableau 5.1). La principale raison pour laquelle l'organomagnésien allylique donne un rendement d'addition particulièrement élevé est que ce dernier est plus réactif que ses homologues supérieurs. La réactivité accrue du réactif allylique vient du fait qu'en plus du mécanisme classique d'addition 1,2 passant par un état de transition à 4 membres, trois autres états de transitions sont aussi théoriquement possibles [104] (Figure 5.3).

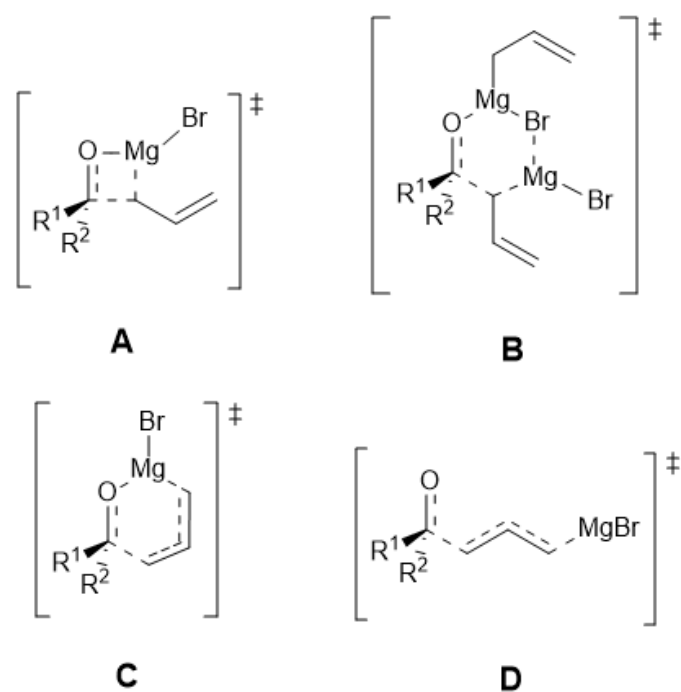


Figure 5.1 États de transition possibles pour un réactif de Grignard allylique (Adapté de [104]).

En plus de l'état de transition classique **A**, les états de transition à 6 membres **B** et **C** sont aussi possibles pour un réactif de Grignard allylique. Ces deux états de transitions sont surtout présents pour les carbonyles et les systèmes allyliques présentant peu d'encombrement stérique. Étant donné que les états de transitions à 6 membres sont souvent faibles en énergie à cause de leurs arrangements spatiaux minimisant les contraintes stériques et énergétiques, la possibilité pour un réactif de Grignard allylique de passer par ces états de transitions augmente substantiellement le rendement d'addition. L'état de transition ouvert de type substitution électrophile aliphatique bimoléculaire prime ( $S_E2'$ ) **D** est aussi théoriquement réalisable, bien que certaines études révèlent qu'il ne serait pas l'état de transition le plus optimal pour ce genre de réaction [105,106].

Les réactifs de Grignard formés à partir des bromoalcènes plus longs ne peuvent que passer par l'état de transition **A**. Cet état de transition étant plus énergétique que les états **B** et **C**, les réactifs de Grignard non allyliques sont donc moins prompts à s'ajouter rapidement aux carbonyles. Cette baisse de réactivité vis-à-vis l'addition entraîne une compétition entre la réaction d'addition et des réactions d'énolisation et de réduction illustrés à la Figure 5.4.

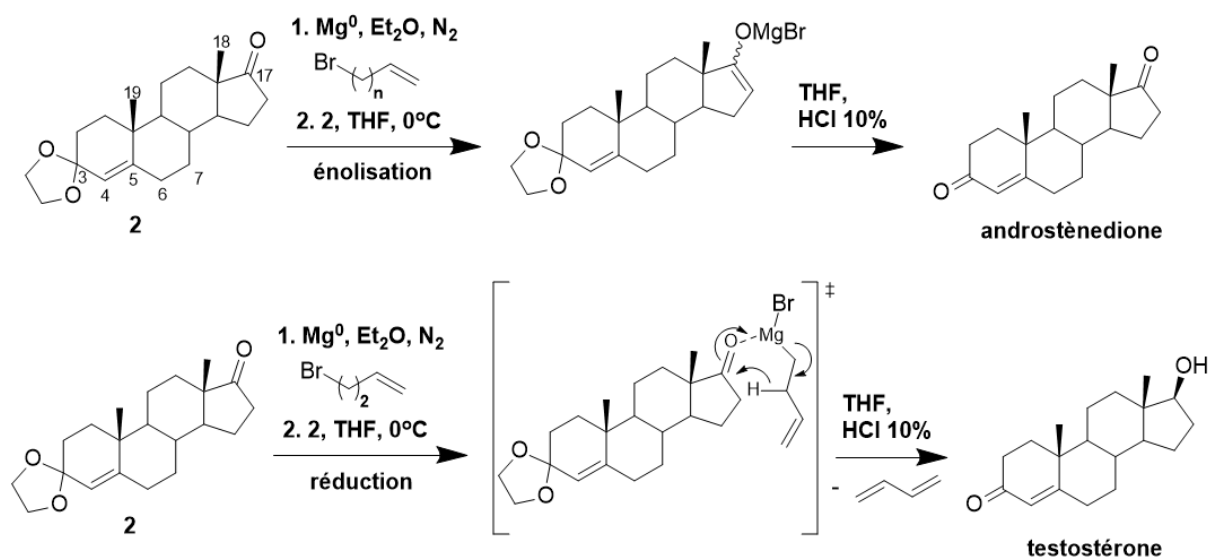


Schéma 5.3 Phénomènes d'énolisation et de réduction possibles lors d'une réaction entre **2** et des réactifs de Grignard plus long.

Bien que les réactifs de Grignard fabriqués à partir des bromoalcènes supérieurs soient moins réactifs vis-à-vis les réactions d'addition que les réactifs de Grignard allylique, ils possèdent tout de même un caractère basique et peuvent participer à des réactions d'énolisation. Dans ces réactions, le réactif organomagnésien vient arracher un proton en alpha du carbonyl afin de former l'énolate de bromure de magnésium [107]. Cet énolate sera par la suite hydrolysé en énol lors d'un lavage acide, puis l'énol se tautomérisera en cétone, générant ainsi l'androstènedione comme produit (après la déprotection de l'énone sur le carbone 3).

Les réactifs de Grignard possédant des hydrogènes sur un carbone  $sp^3$  en bêta du magnésium peuvent aussi participer à des réactions de réduction. Lorsque cela se produit, le magnésium du réactif vient se complexer à l'oxygène du carbonyle, donnant lieu à un état de transition à 6 membres dans lequel l'hydrogène en bêta du magnésium est transféré sur le carbone du carbonyle [108]. Cet état de transition pour le bromure de but-3-èn-1-ylmagnésium est illustré à la Figure 5.4. Le retour des électrons forme un lien entre l'oxygène et le bromure de magnésium, ce qui entraîne l'élimination de ce dernier du réactif de base, formant une insaturation supplémentaire sur l'alcène. La stéréochimie de la réduction est orientée par la position du méthyle 18. Seule la réduction sur la face alpha du stéroïde fut observée, régénérant la testostérone comme produit après la déprotection de l'énone.

L'androstènedione et la testostérone furent les principaux produits observés dans la préparation des molécules **32-6**. Afin de bonifier le rendement d'addition, plusieurs techniques furent tentées. Tout d'abord, les concentrations des réactifs et la température furent modifiées à plusieurs reprises afin de favoriser la réaction d'addition. Ensuite, des acides de Lewis comme le chlorure de zinc (II) et le chlorure de cérium (III) furent également employés. Ces acides peuvent se complexer à la cétone afin de polariser le carbonyle et de faciliter les attaques nucléophiles [109]. En se complexant au carbonyle, ils peuvent également perturber l'état de transition à 6 membres impliqué dans la réaction de réduction.

Ces deux méthodes furent malheureusement sans succès. Nous avons donc opté pour l'utilisation d'organolithiens. Puisque la charge négative est plus vive sur le carbone des organolithiens que sur les organomagnésiens, ils sont plus réactifs. Ces derniers sont formés en réduisant le lien carbone – brome d'un bromoalcène à l'aide de lithium métallique. La réaction est réalisée dans l'éther diéthylique à 0°C. Une fois le réactif formé, ce dernier est ajouté goutte à goutte à une solution du composé **2** dans le THF à -40°C. L'organolithien est ajouté lentement afin de ne pas provoquer une élévation trop



brusque de la température. Une température basse permet à la fois d'éviter que la réaction ne s'emballe et de minimiser les réactions secondaires [110]. Une fois l'ajout complété, la réaction est laissée sous agitation pendant 30 minutes avant d'être amenée à la température ambiante. Après un lavage acide et une agitation pendant 16 heures dans un mélange THF : HCl 10% (1 : 1), le produit peut être purifié par chromatographie sur colonne. Cette voie de synthèse fut employée et optimisée avec le 5-bromo-1-pentène et le rendement fut de 38%. Dans ce cas-ci, les réactifs organolithiens semblent promouvoir davantage l'addition au carbonyle par rapport aux réactifs de Grignard.

### 5.1.3 Dimérisation des précurseurs **3<sub>1-6</sub>**

Les précurseurs **3<sub>1-6</sub>** possèdent maintenant un groupement fonctionnel alcène terminal qui peut réagir dans une réaction de métathèse d'oléfines. Ce type de réaction organométallique permet de coupler deux alcènes entre eux par l'intermédiaire d'un mécanisme catalytique impliquant une suite de cycloaddition [2+2] et de rétro [2+2] [111] (Figure 5.5).

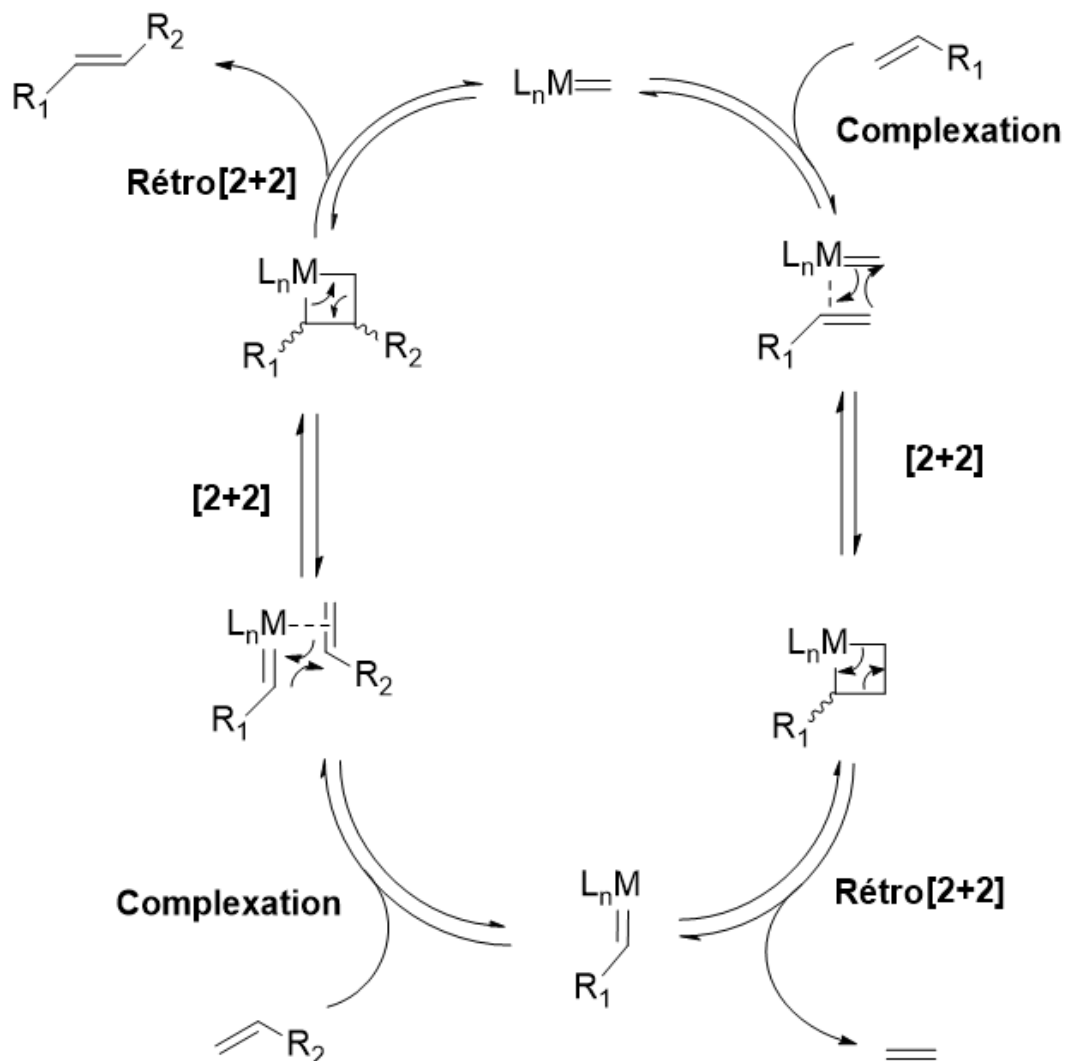


Schéma 5.4 Schéma général d'une réaction de métathèse d'oléfines.

Le mécanisme général d'une réaction de métathèse d'oléfines est illustré à la Figure 5.5. L'une des forces motrices de la réaction est la formation d'éthène, qui peut être éjecté du mélange réactionnel en raison de son faible point d'ébullition et ainsi déplacer l'équilibre de la réaction vers les produits, en vertu du principe de Le Châtelier. Aussi, ce genre de réaction mène à la formation d'alcènes *trans* puisque ces derniers sont thermodynamiquement plus stables que leurs homologues *cis*. Il est aussi à noter que les alcènes terminaux ont plus de chances de réagir facilement dans une réaction de

métathèse, étant moins stériquement encombrés et par le fait même plus accessible pour le catalyseur. La complexation au métal en est donc facilitée, de même que les cycloadditions [2+2]. Cela limite donc la possibilité que le catalyseur réagisse avec un produit de la réaction, car ces derniers possèdent une chaîne porteuse d'un groupement alcène non terminal.

Plusieurs types de complexes organométalliques peuvent être utilisés afin de faire des réactions de métathèse d'oléfines, comme des complexes à base de tungstène, de molybdène et de titane [112-114]. Toutefois, les complexes à base de ruthénium(II) sont souvent employés étant donné leur grande stabilité et leur capacité à tolérer l'humidité, l'oxygène et une vaste gamme de groupements fonctionnels [115] (Figure 5.6).

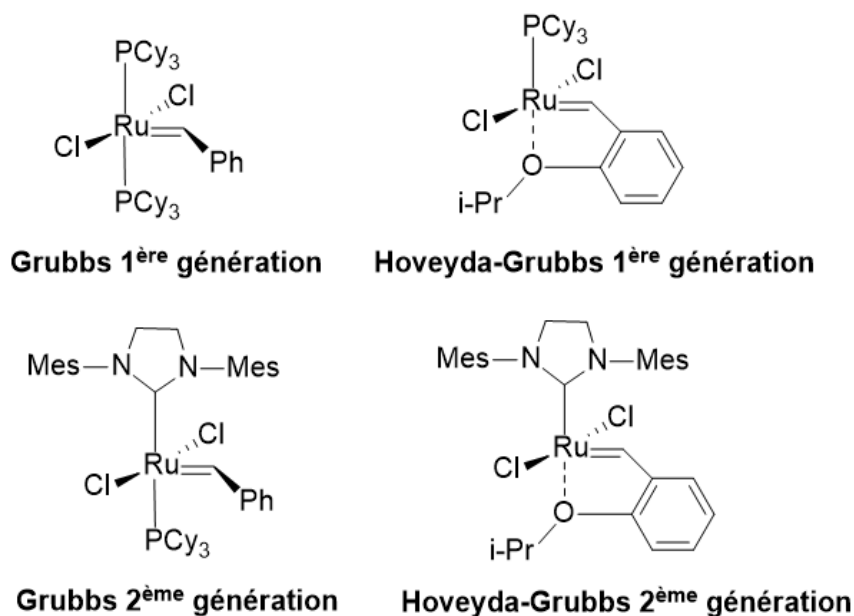


Figure 5.2 Représentations de certains catalyseurs à base de ruthénium(II) utilisés pour des réactions de métathèse d'oléfines.

L'un des catalyseurs de ruthénium(II) actuellement les plus en vogue est le catalyseur d'Hoveyda-Grubbs 2<sup>ème</sup> génération. Le design du catalyseur permet de peser ce dernier à l'air libre et de ne pas craindre qu'il y aille des traces d'eau dans la réaction, car ce catalyseur possède une tolérance remarquable à l'eau, à l'humidité et à l'oxygène. De plus, il possède une activité catalytique remarquable vis-à-vis la réaction de métathèse d'oléfines. C'est donc ce catalyseur qui fut utilisé afin de générer les dimères **4**<sub>1-6</sub> (Figure 5.7).

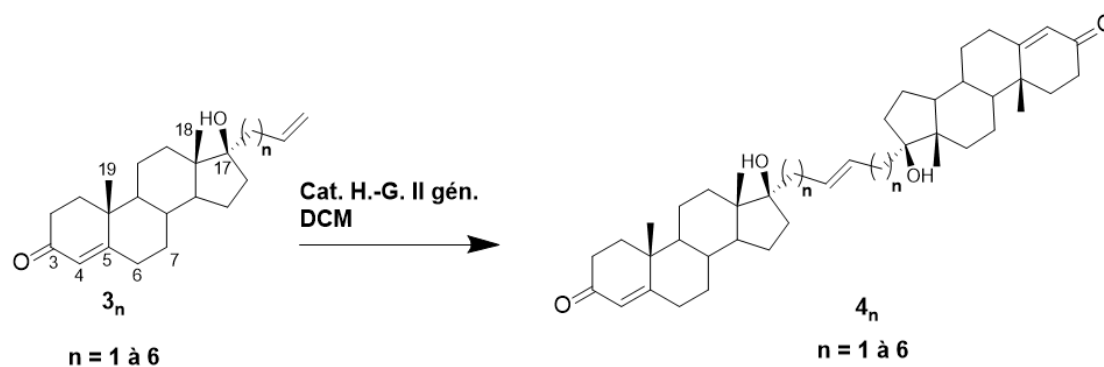


Schéma 5.5 Synthèse des dimères de testostérone fonctionnalisés en 17 $\alpha$ .

À l'aide de la réaction de métathèse d'oléfines, il a été possible de générer tous les dimères **4**<sub>1-6</sub>. Toutefois, bien que les analyses spectrales initiales semblaient indiquer que les produits isolés étaient purs, des analyses HRMS et LC-MS réalisées à la fin des synthèses ont révélé que les produits obtenus furent, pour la plupart, isolés avec des analogues possédant des masses variant d'une unité méthylène ou éthylène (Tableau 5.2).

**Rendements des réactions de dimérisation  
et proportion des homologues obtenus**

Précurseurs	rendement de la réaction (%)	Proportion du produit $4_n$ (%)	Proportion du produit " $4_n - CH_2$ " (%)	Proportion du produit " $4_n - C_2H_4$ " (%)	Proportion du produit " $4_n + CH_2$ " (%)
<b>3<sub>1</sub></b>	41	100,0	0,0	0,0	0,0
<b>3<sub>2</sub></b>	24	7,5	21,9	70,6	0,0
<b>3<sub>3</sub></b>	29	38,3	30,9	30,8	0,0
<b>3<sub>4</sub></b>	43	43,5	35,5	0,0	21,0
<b>3<sub>5</sub></b>	47	46,8	53,2	0,0	0,0
<b>3<sub>6</sub></b>	50	11,1	40,0	48,9	0,0

Tableau 5.2 Rendements des réactions de dimérisation et proportion des homologues obtenus.

Les rendements des réactions de dimérisations varient entre 24% et 50%. Hormis, le dimère **4<sub>1</sub>**, tous les autres dimères furent obtenus sous forme de mélanges inséparables par chromatographie. Les analyses spectrométriques révèlent que les squelettes stéroïdes semblent intacts. Les pertes de masses (ou le gain de masse dans le cas du dimère **4<sub>4</sub>**) semblent venir d'une variation d'unités méthylènes dans les connecteurs moléculaires reliant les deux unités testostérone. Une telle perte est indiscernable par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN). Puisque tous les produits de départ étaient purs, les causes entraînant la formation des homologues sont uniquement liées à la réaction de dimérisation. L'hypothèse la plus probable est que le catalyseur isomérisé le précurseur de départ avant la réaction de dimérisation, ce qui permet d'obtenir un éventail de produits lors de la réaction subséquente. Certaines études ont permis d'élucider le mécanisme de ces réactions secondaires se produisant lors des réactions de métathèses d'oléfine [116] (Figure 5.8).

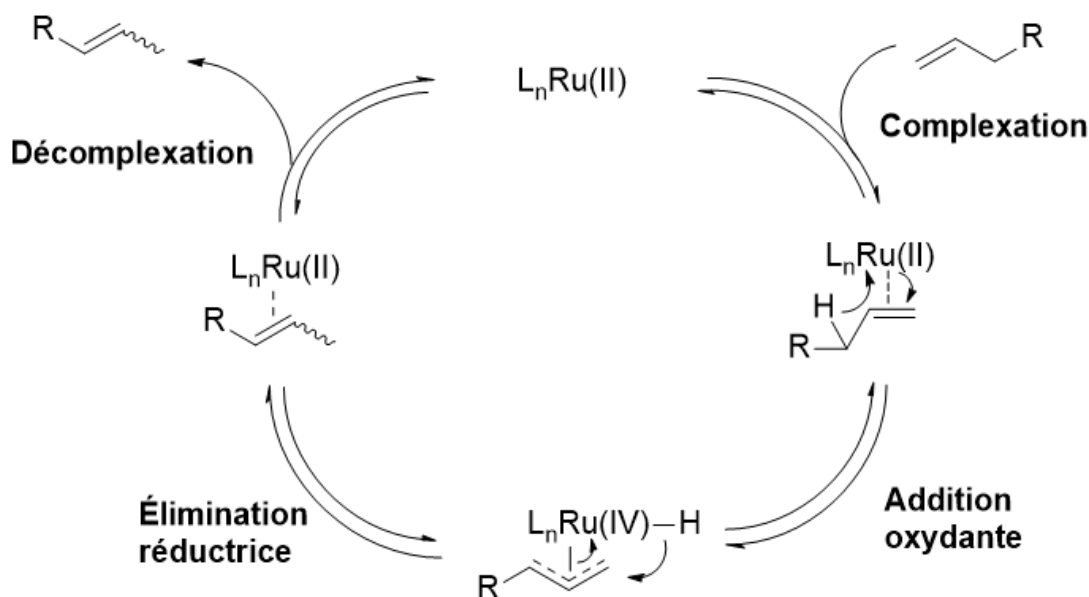


Schéma 5.6 Mécanisme probable d'isomérisation des précurseurs  $3_{2-6}$  (Adapté de [116]).

Afin d'isomériser les alcènes de départ, le catalyseur complexe d'abord l'alcène puis réalise une addition oxydante entre l'hydrogène situé sur le carbone en alpha de l'alcène et de reste de la chaîne de carbone. Le ruthénium passe donc à un degré d'oxydation +IV (qui est un état d'oxydation possible pour ce dernier) et cette transformation génère un complexe  $\pi$ -allyle sur la chaîne carbonée. La raison pour laquelle le précurseur  $3_1$  est épargné par cette réaction est justement parce que le complexe de ruthénium(II) ne peut pas faire d'addition oxydante dans ce cas à cause de l'encombrement stérique généré par la proximité de l'unité stéroïde. Une fois l'addition oxydante complétée, une élimination réductrice peut envoyer l'hydrogène lié au ruthénium(IV) sur le carbone terminal de la chaîne de carbone, formant ainsi un alcène disubstitué. Cet alcène pourra ensuite réagir dans une réaction de métathèse, éjectant ainsi du propène et menant à des produits possédant des unités méthylènes de moins que les produits attendus. Aussi, étant donné que ces réactions sont réversibles, il est possible de réisomériser les précurseurs afin de faire migrer l'alcène encore plus

loin dans la chaîne de carbone. D'ailleurs, puisque toutes les réactions impliquées ici sont à l'équilibre, il est important de noter que les produits qui sont les plus stables au niveau thermodynamique seront favorisés, ce qui justifie l'isomérisation d'alcènes terminaux en alcènes disubstitués. Toutefois, dans le cas du dimère **44**, le gain d'une unité méthylène est plus difficilement explicable. L'une des pistes est qu'une suite de réactions dans le milieu aille entraîner un dégagement de propène, qui aurait ensuite pu faire une métathèse croisée sur le dimère **44**. Cela provoquerait ainsi le gain d'un groupement méthyle sur l'alcène central du dimère, augmentant la masse de ce dernier d'une unité méthylène. Les analyses spectrales ne permettent toutefois pas de corroborer cette hypothèse étant donné les recouvrements de signaux importants dans les spectres RMN et les spectres de masse des composés stéroïdiens.

## 5.2 Synthèse du dimère de DHT fonctionnalisé en $17\alpha$

En empruntant la voie de synthèse utilisée pour générer les dimères de la testostérone, il a été possible de fabriquer un dimère de DHT possédant une chaîne but-2-ène en position  $17\alpha$  (Figure 5.9).

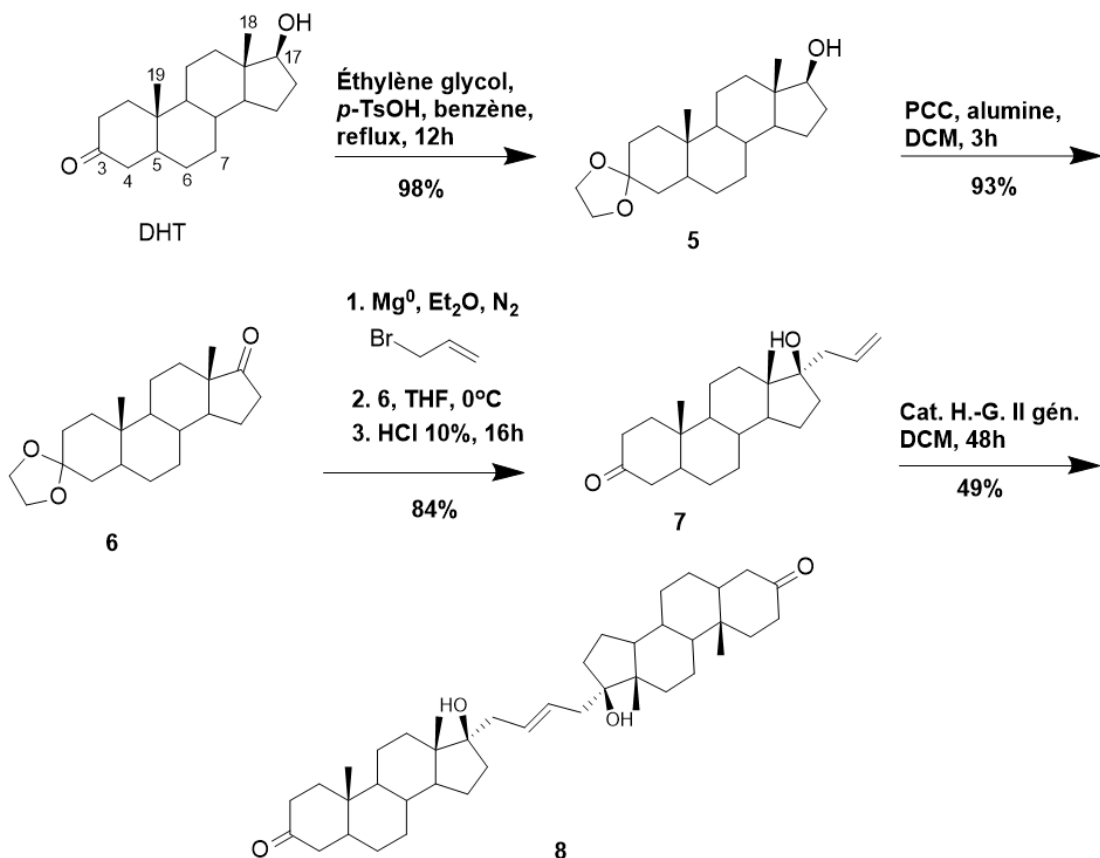


Schéma 5.7 Schéma de synthèse du dimère de DHT **8**.

La première étape de la synthèse est bien entendu la protection de la cétone sur le carbone 3. La réaction donne le produit **5** avec un rendement 98%, une nette amélioration par rapport à la protection de la testostérone qui se déroulait avec un rendement de 43%. Cela vient prouver que l'énone est plus difficile à protéger sous forme d'acétal que la cétone, potentiellement à cause de la plus faible électrophilicité du carbonyle de l'énone et de la fragilité du composé **2** vis-à-vis l'acidité [117]. Ensuite, l'oxydation et la réaction de Grignard (incluant la déprotection de la cétone) se sont déroulées avec des rendements de 93% et 84%, respectivement pour les produits **6** et **7**. Le réactif de Grignard fut employé pour l'addition de la chaîne allyle au carbonyle 17, car il s'est avéré efficace lors de la formation du produit **31**. Aussi, il sera possible de comparer les propriétés biologiques du précurseur **7**, dérivé 17 $\alpha$ -



allyldihydrotestostérone, à l'analogue à base de testostérone **3<sub>1</sub>**, un antiandrogène connu [118].

Enfin, le dimère **8** a pu être synthétisé à l'aide d'une réaction de métathèse d'oléfines avec un rendement de 49%. Étant donné que la chaîne du précurseur **7** est une chaîne allylique, aucune réaction secondaire ne fut observée lors de la formation de ce dimère. Le produit **8** fut isolé sous forme de produit pur et homogène.

### 5.3 Activité biologique des composés **3<sub>1-6</sub>**, **4<sub>1,4,5</sub>**, **7**, **8** et du CPA

Jusqu'à présent, seuls des tests préliminaires ont été réalisés concernant l'activité antiproliférative des nouvelles molécules. Bien que les dimères **4<sub>2-6</sub>** ne furent qu'isolés sous forme de mélange, des tests préliminaires ont été entrepris sur certains de ces dimères, car il est quand même possible de constater l'influence de la longueur du connecteur moléculaire sur l'activité biologique des dimères (Tableau 5.3).

**Activités antiprolifératives des composés vis-à-vis la lignée cellulaire LNCaP (RA+) évaluées par un test MTT**

composés	IC <sub>50</sub> (μM)
CPA	151,7 <sup>1</sup>
<b>3<sub>1</sub></b>	65,2 ± 2,6
<b>3<sub>2</sub></b>	122,2 ± 1,3
<b>3<sub>3</sub></b>	66,6 <sup>1</sup>
<b>3<sub>4</sub></b>	50,3 ± 6,2
<b>3<sub>5</sub></b>	34,9 ± 2,9
<b>3<sub>6</sub></b>	33,6 ± 5,8
<b>4<sub>1</sub></b>	76,3 <sup>1</sup>
<b>4<sub>4</sub></b>	289,7 <sup>1</sup>
<b>4<sub>5</sub></b>	N/A <sup>2</sup>
<b>7</b>	59,9 ± 2,0
<b>8</b>	N/A <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Pas assez de réplicats afin de calculer un intervalle statistique

<sup>2</sup> Non évalué car les composés n'étaient pas assez solubles

Tableau 5.3 Activités antiprolifératives des composés vis-à-vis la lignée cellulaire LNCaP (RA+) évaluées par un test MTT.

Les composés n'ont été testés que sur les cellules LNCaP qui exprime le RA. Il est donc impossible pour l'instant de commenter si les nouvelles molécules présentent une activité cytotoxique sélective envers les cellules dépendantes des androgènes. Toutefois, plusieurs observations intéressantes émanent de ces résultats. Tout d'abord, on peut constater qu'à peu près toutes les molécules sont plus actives que le CPA. Ceci n'est pas si étonnant, car le CPA est connu pour être surtout actif *in vivo*, mais cela témoigne toutefois que les nouveaux composés possèdent un certain intérêt médical [119].

Si l'on observe l'activité des précurseurs **3<sub>1-6</sub>**, on remarque que la longueur idéale de la chaîne terminale semble être de 7 ou 8 carbones. Alors que l'allyltestostérone, un antiandrogène connu, possède un IC<sub>50</sub> de 65,2 ± 2,6 μM, les composés **3<sub>5</sub>** et **3<sub>6</sub>** possèdent des concentrations inhibitrices de 34,9 ± 2,9 μM et de 33,6 ± 5,8 μM,

respectivement. Ces composés sont donc environ 2 fois plus actifs *in vitro* que l'allyltestostérone et 5 fois plus actifs que le CPA. Il semble donc qu'une chaîne plus longue puisse améliorer l'activité biologique de l'allyltestostérone.

Les résultats sur la dimérisation ne sont toutefois pas très concluants. Seul le dimère de testostérone pur **4<sub>1</sub>** et les dimères **4<sub>4</sub>** et **4<sub>5</sub>** furent testés pour leurs activités biologiques. Il est inutile de tester tous les dimères étant donné que la plupart furent isolés sous forme de mélange, l'idée est donc de tester seulement quelques dimères plus longs afin de déterminer l'influence générale de la longueur de la chaîne sur l'activité biologique. Tout d'abord, on remarque que le dimère **4<sub>5</sub>** n'a pas pu être testé, étant donné qu'il n'était pas soluble dans les conditions du test MTT. Les dimères possédant de longues chaînes sont moins solubles en milieux aqueux, ce qui les rend moins intéressants pour des applications *in vivo*. Par ailleurs, le dimère **4<sub>4</sub>** démontre un IC<sub>50</sub> de 289,7 µM. Ce dimère est pratiquement inactif, alors que le dimère d'allyltestostérone **4<sub>1</sub>**, possède une activité antiproliférative de 76,3 µM. Les dimères plus longs semblent donc moins actifs, ce qui est cohérent avec la théorie des dimères, puisqu'un connecteur moléculaire trop long pourrait permettre le repliement naturel du complexe homodimérique ligand-RA, n'empêchant pas la réponse biologique normale des cellules. Ainsi, le dimère le plus actif qui ait été testé ici est le dimère de testostérone **4<sub>1</sub>**, mais ce dimère possède une activité un peu moindre que le précurseur d'allyltestostérone. Il semble donc ici que la stratégie de dimérisation n'ait pas porté fruit en ce qui concerne l'amélioration de l'activité biologique sur les cellules hormonodépendantes. Il faudra comparer avec une lignée cellulaire ne possédant pas le RA afin de déterminer si le dimère **4<sub>1</sub>** possède une toxicité plus ou moins sélective que son précurseur.

Finalement, il a été impossible de tester le dimère de DHT **8** puisqu'il n'était pas soluble dans les conditions du test MTT. Par contre, le composé précurseur de DHT **7** possède un IC<sub>50</sub> de 59,9 ± 2,0 µM, ce qui est légèrement supérieur à l'activité de

l'allyltestostérone **3<sub>1</sub>**. Ce résultat n'est pas surprenant puisque la DHT est le ligand naturel du RA. Bien que la testostérone soit convertie en DHT dans la cellule par l'enzyme 5 $\alpha$ -réductase, ce résultat prouve que de fabriquer une drogue à base de DHT peut faciliter le mode d'action des composés stéroïdiens, puisqu'aucune interaction initiale avec l'enzyme 5 $\alpha$ -réductase n'est requise. Étant donné que les dérivés de stéroïdes ne sont pas les substrats naturels de l'enzyme, il est logique que les molécules à base de DHT interagissent plus facilement avec le RA et exhibent de meilleures activités antiprolifératives. Cette tendance devrait se maintenir *in vivo*.

#### 5.4 Étude de l'affinité avec le cytochrome P450 3A4

Il a été possible de tester l'affinité des précurseurs **3<sub>1</sub>** et **7** ainsi que leurs dimères correspondants **4<sub>1</sub>** et **8** sur le site catalytique du cytochrome P450 3A4. Ces dimères et leurs précurseurs furent sélectionnés puisqu'ils sont de grande pureté. De plus, il sera possible de comparer les résultats obtenus avec ceux des composés *trans*-**9** et *cis*-**9**, des dimères possédant la même chaîne but-2-ène en position 7 $\alpha$  et dont les deux unités testostérone ont démontré la capacité d'entrer dans la poche catalytique du cytochrome et de s'y lier [120] (Figure 5.10).

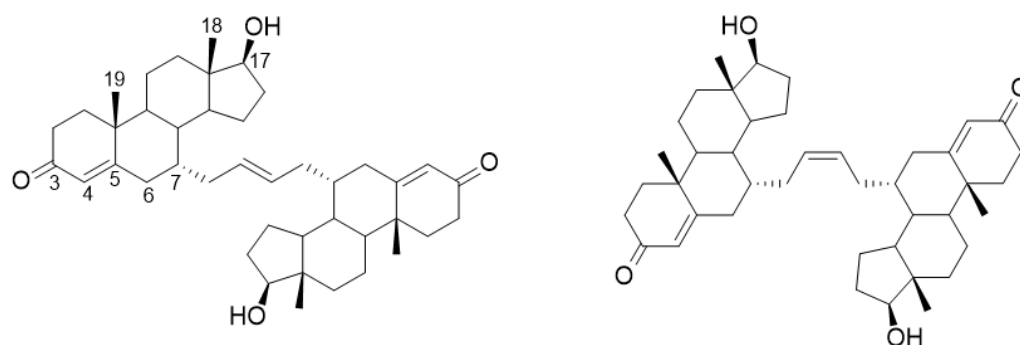


Figure 5.3 Représentation des dimères *trans-9* et *cis-9*.

L'affinité des monomères **3<sub>1</sub>** et **7** fut d'abord testée afin de déterminer si le squelette de base de la série est intéressant au point de vue de l'amarrage au centre catalytique du cytochrome. Il sera également possible de comparer les résultats des constantes de dissociation aux résultats des dimères. Tout d'abord, on constate que les constantes de dissociation spectrales des composés **3<sub>1</sub>** et **7** sont dans l'ordre du micromolaire, ce qui signifie que ces molécules peuvent se lier de manière assez solide au centre actif du cytochrome (Tableau 5.4). Une constante de dissociation spectrale est une constante de dissociation mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. En fait, le centre catalytique possède une bande d'absorption à 417 nm causée par la présence d'un groupement hème. Lorsqu'un substrat se lie au centre actif, l'environnement du groupement hème est déstabilisé et la longueur d'absorption est décalée à 386 nm. Il est donc possible de déterminer la constante de dissociation spectrale en faisant varier la concentration du ligand. Cette constante est égale à la concentration de substrat requise afin d'obtenir une absorbance à 386 nm qui est égale à la moitié de l'absorbance maximum, c'est-à-dire quand le centre actif est entièrement lié à des ligands [121]. Le précurseur de DHT **7** semble légèrement plus actif que le précurseur de testostérone **3<sub>1</sub>**. Étant donné que la DHT est généralement un meilleur ligand dans l'organisme que la testostérone, du moins pour le RA, ces résultats concordent avec les prédictions théoriques.

**Affinité des monomères **3<sub>1</sub>** et **7**  
envers le cytochrome P450 3A4**

composés	Constante de dissociation spectrale ( $\mu\text{M}$ )	Coefficient de Hill
<b>3<sub>1</sub></b>	22	1,52
<b>7</b>	17	1,76

Tableau 5.4 Affinité des monomères **3<sub>1</sub>** et **7** envers le cytochrome P450 3A4.

Le coefficient de Hill fut également mesuré. Ce coefficient renseigne sur la sensibilité de la courbe dose-réponse et sur le mode de liaison des molécules de substrats au site de liaison [122]. Un coefficient de Hill supérieur à 1 indique un mode de liaison coopératif, c'est-à-dire qu'une fois qu'un ligand s'est lié au récepteur, ce dernier exhibe une affinité accrue vis-à-vis d'autres molécules de ligand, qui peuvent donc plus facilement se lier au récepteur. Dans le cas présent, les deux molécules possèdent des coefficients de Hill supérieur à 1, ce qui indique que les précurseurs des dimères semblent posséder une affinité relativement bonne envers le centre catalytique du cytochrome P450 3A4.

Le tableau 5.5 présente les résultats relatifs à l'affinité des dimères par rapport au site catalytique du cytochrome P450 3A4. Il est d'abord possible de constater que chacun des nouveaux dimères se lie plus fortement au récepteur que son précurseur respectif, étant donné que les constantes de dissociation spectrale sont plus faibles. Ici, le dimère se liant le plus fortement au cytochrome est le dimère de testostérone **4<sub>1</sub>**, qui possède une constante de dissociation spectrale de 0,24  $\mu\text{M}$ . Ce résultat est environ 40 fois supérieur à l'affinité du dimère de DHT **8**. La testostérone est connue pour se lier au cytochrome P450 3A4, mais il avait été prédit que le dimère de DHT pourrait possiblement être plus actif étant donné que dans le métabolisme sexuel, la DHT est le meilleur ligand du RA. Il est toutefois clair que c'est bel et bien le dimère de testostérone qui se lie le plus fortement au récepteur. D'ailleurs, cette théorie semble

être corroborée par le décalage haut spin. Le décalage haut spin est directement lié à la constante de dissociation spectrale, il indique de manière spécifique l'intensité avec laquelle un ligand vient perturber l'environnement électronique du groupement hème [123]. On constate que les molécules *cis-9* et **4<sub>1</sub>** exhibent des décalages de 99% et 92%, respectivement. Cela signifie que ces molécules n'ont pratiquement aucun problème à s'approcher du centre catalytique de l'enzyme. Toutefois, le composé **8** démontre un décalage haut-spin de 33%, ce qui est conséquent avec la faible constante de dissociation spectrale de cette molécule.

<b>Affinité des dimères <b>4<sub>1</sub></b>, <b>8</b> et <b>9</b> envers le cytochrome P450 3A4</b>			
composés	Constante de dissociation spectrale (μM)	décalage haut spin (%)	IC <sub>50</sub> (μM)
<i>trans-9</i>	>10	N/A	N/A
<i>cis-9</i>	0,37	99	0,8
<b>4<sub>1</sub></b>	0,24	92	0,6
<b>8</b>	9,6	33	>10

Tableau 5.5 Affinité des dimères **4<sub>1</sub>**, **8** et **9** envers le cytochrome P450 3A4.

L'IC<sub>50</sub>, c'est-à-dire la concentration requise pour inhiber 50% de l'activité du cytochrome fut également mesurée. Théoriquement, les résultats obtenus devraient être proportionnels aux constantes de dissociation des composés. Le cytochrome P450 3A4 possède plusieurs activités biologiques, mais l'activité qui fut étudiée ici est l'activité de la débenzylase. Le 7-benzyloxy-4-trifluorométhylcoumarin (BFC) fut employé comme substrat pour la débenzylation [124]. Sans grande surprise, le composé **8** présenta une IC<sub>50</sub> supérieure à 10 μM, ce qui va de pair avec son affinité modeste vis-à-vis le cytochrome. Les résultats des composés *cis-9* et **4<sub>1</sub>** furent toutefois excellents. Le composé *cis-9* a pu perturber la débenzylation du BFC avec un IC<sub>50</sub> de 0,8 μM. Cette perturbation est encore meilleure pour la molécule **4<sub>1</sub>** qui exhibe un IC<sub>50</sub> de 0,6 μM. Ces résultats concordent avec les constantes de dissociation spectrale et les décalages haut spin observés pour ces deux composés.

Trois constats émanent des résultats obtenus en ce qui a trait à l'interaction des stéroïdes avec le cytochrome P450 3A4. Tout d'abord, il est possible de conclure que la stratégie de dimérisation semble être une approche efficace afin de moduler les propriétés d'une molécule. Non seulement chaque dimère possède des propriétés différentes des monomères, mais les dimères se sont liés plus fortement au site actif du cytochrome et ont davantage modulé sa réponse biologique sur l'activité de la débenzylase, tel que prédit par la théorie. Deuxièmement, le type d'androgène utilisé (testostérone vs DHT) affecte grandement l'affinité du composé face au site catalytique. En effet, bien que le monomère de DHT **7** ait légèrement plus d'affinité que le monomère de testostérone **3<sub>1</sub>**, nous observons totalement l'inverse lorsque ces composés sont dimérisés. Les dimères à base de testostérone se lient beaucoup plus fortement au site actif que le dimère de DHT. Cela met donc en exergue le fait que bien que la DHT soit un meilleur ligand du RA *in vivo*, la testostérone peut être un meilleur substrat pour certaines enzymes, comme dans le cas présent. En fait, la DHT est possiblement un moins bon substrat pour le site catalytique du cytochrome P450 3A4, car l'absence d'une insaturation entre les carbones 4 et 5 du cycle A rend la DHT moins planaire que la testostérone. Les molécules à base de DHT ont donc probablement plus de difficulté à s'insérer dans la poche catalytique du cytochrome. Elles sont donc moins susceptibles d'affecter la conformation et l'activité catalytique du site actif. Enfin, le troisième constat qu'il est possible de déduire est que le carbone sur lequel se trouve le connecteur moléculaire impacte de manière significative l'activité des dimères. La différence entre les constantes de dissociation spectrales des dimères *trans-9* et *cis-9* avait déjà permis de déterminer que la géométrie de l'alcène d'un connecteur but-2-ène était d'une importance capitale pour l'affinité du dimère. Ici, l'excellente affinité du dimère **4<sub>1</sub>** pour le cytochrome outrepassait largement celle du dimère *trans-9* et légèrement celle du dimère *cis-9*. Cela confirme donc que la position 17 $\alpha$  est un bon choix pour l'élaboration de drogues stéroïdiennes.



## CHAPITRE VI

### CONCLUSION

Dans le cadre de ce projet, il a été possible de synthétiser des dimères d'androgènes possédant des propriétés biologiques intéressantes. Ces dimères sont connus pour se lier au RA dans les cellules possédant les éléments de réponses des androgènes. En se liant, ces composés perturbent le repliement du complexe homodimérique RA-ligands et inhibent la translocation du RA dans le noyau cellulaire. Ceci a pour effet de limiter les effets biologiques habituellement associés aux androgènes, comme la croissance cellulaire. De cette manière, des dimères d'androgènes peuvent compétitionner avec les androgènes libres et trouver applications dans le domaine de l'hormonothérapie contre le cancer de la prostate.

Le premier objectif du projet fut de synthétiser une deuxième génération de dimères d'androgènes fonctionnalisés en position  $7\alpha$  sur le squelette stéroïde. La première génération de dimères, synthétisée en 2010, est composée d'un connecteur moléculaire but-2-ène reliant deux unités testostérone. La nouvelle génération possède quant à elle un connecteur triène et comprend un dimère de testostérone **14 $\beta$** , un dimère d'épitéstostérone **14 $\alpha$**  et un dimère d'androstènedione **14**. Le dimère de testostérone naturel **14 $\beta$**  s'est avéré être le meilleur candidat *in vitro*, outrepassant largement les résultats de l'activité antiproliférative compilés pour les dimères de la première génération. Ce nouveau composé possède une activité antiproliférative environ 5 fois supérieure au CPA et peut inhiber totalement la croissance cellulaire des cellules

LNCaP induite par la testostérone à seulement 0,5  $\mu\text{M}$ . Cette activité antiandrogénique est de 0,25  $\mu\text{M}$  pour le dimère **14 $\alpha$** . Ces concentrations étant largement en deçà des seuils de toxicité observés pour ces molécules, ceci démontre que la deuxième génération de dimère peut efficacement faire compétition à la testostérone tout en demeurant à des concentrations non toxiques.

Les dimères ont également été testés pour leurs affinités sur le site actif du cytochrome P450 3A4. Aucun des dimères n'a malheureusement pu démontrer autant d'affinité pour le site catalytique du cytochrome que les dimères de la première génération. Ceci est possiblement dû au fait que la structure rigide et la taille un peu plus importante des dimères de la deuxième génération les empêchent d'accéder à la poche catalytique du cytochrome. Ceci est corroboré par le faible décalage haut spin des dimères, qui varie entre  $36 \pm 2\%$  et  $49 \pm 3\%$ . Toutefois, c'est probablement cette rigidité qui leur permet d'exhiber une si formidable activité antiandrogénique.

La prochaine étape sera de tester le potentiel biologique des molécules dans un contexte *in vivo*, à l'aide d'un modèle murin. Les résultats *in vivo* varient souvent par rapport aux résultats *in vitro*, mais le design des dimères devrait leur permettre de bien tolérer les conditions de l'organisme. Par ailleurs, il sera intéressant d'observer comment le dimère d'androstènedione **14** se comportera *in vivo*, puisque l'androstènedione est un précurseur de plusieurs composés stéroïdiens dans l'organisme [125]. Le métabolisme de ce dimère pourrait donc entraîner des transformations qui généreront des résultats surprenants.

Le deuxième objectif du projet de recherche fut de concevoir une série de dimères d'androgènes fonctionnalisés à la position 17 $\alpha$ , une position qui fut choisie puisqu'il s'agit du site de fonctionnalisation de nombreuses drogues stéroïdiennes connues et déjà sur le marché. Il a été possible de synthétiser les dimères **4<sub>1-6</sub>** en générant d'abord les composés alkylés **3<sub>1-6</sub>**. Ces composés comprennent une unité testostérone possédant des chaînes alcène terminal plus ou moins longues, en position 17 $\alpha$ . En utilisant des

réactions de métathèses d'oléfines sur ces deniers, il a été possible de fabriquer les dimères **4**<sub>1-6</sub>. Malheureusement, des réactions d'isomérisation secondaires ont entraîné des complications au niveau de la synthèse des dimères. Les composés **4**<sub>2-6</sub> n'ont été isolés que sous forme de mélange avec des analogues possédant des connecteurs moléculaires plus ou moins longs. Afin de pallier à ce problème, un temps de réaction plus court lors de la réaction de dimérisation pourrait être employé. Sinon, une autre réaction de couplage ou une autre voie réactionnelle pourrait être utilisée.

Certains résultats biologiques intéressants ont pu être observés. Tout d'abord, les précurseurs **3**<sub>5</sub> et **3**<sub>6</sub> sont environ deux fois plus actifs *in vitro* que le précurseur allyltestostérone **3**<sub>1</sub>, qui est un antiandrogène connu. Bien que la capacité antiandrogénique de ces composés ne se base pas sur le principe des dimères, il est intéressant d'observer qu'une variation de la chaîne terminale semble améliorer les propriétés biologiques de ce genre de molécule. Toutefois, la dimérisation des composés possédant une longue chaîne latérale ne semble pas améliorer les propriétés biologiques des précurseurs. Le dimère d'allyltestostérone **4**<sub>1</sub> possède une activité antiproliférative de 76,3  $\mu\text{M}$  vis-à-vis les cellules LNCaP, ce qui est environ 2 fois supérieures au CPA (151,7  $\mu\text{M}$ ), mais un peu inférieur à l'allyltestostérone, qui possède une activité antiproliférative de  $65,2 \pm 2,6 \mu\text{M}$ . Il sera intéressant dans le futur de tester les composés sur des lignées cellulaires ne possédant pas le RA, comme les lignées humaines PC3 et DU-145. Il sera ainsi possible de déterminer si ces composés possèdent une toxicité sélective pour les cellules possédant le RA, ce qui serait théoriquement plausible pour le dimère **4**<sub>1</sub>. Il serait aussi intéressant d'analyser les effets prolifératifs en mesurant l'apoptose afin de mieux supporter les résultats obtenus par MTT. Il est toutefois possible de constater que les dimères plus longs semblent inactifs, étant donné que la longueur de la chaîne est fort probablement inadéquate pour perturber la conformation des complexes RA-ligand dans la cellule. Un constat du travail de recherche est que les dimères possédant des connecteurs moléculaires relativement courts et rigides semblent être les plus intéressants au niveau biologique.

Enfin, des analogues à base de DHT du précurseur **3<sub>1</sub>** et du dimère **4<sub>1</sub>** furent préparés. Le précurseur allyl-DHT **7** fut testé pour son activité antiproliférative vis-à-vis les cellules LNCaP et semble légèrement plus actif que l'allyltestostérone **3<sub>1</sub>**, ce qui est normal puisque la DHT est le ligand le plus puissant du RA. Malheureusement, le dimère de DHT **8** n'a pas pu être testé, car il n'était pas soluble dans les conditions du test MTT. Les dimères **4<sub>1</sub>** et **8** furent toutefois testés pour leurs affinités vis-à-vis le site actif du cytochrome P450 3A4. Le dimère de testostérone **4<sub>1</sub>** est beaucoup plus actif que son homologue à base de DHT, fort possiblement parce que la testostérone est un meilleur substrat pour cet enzyme et qu'il peut s'insérer plus facilement dans la poche catalytique. Le dimère **4<sub>1</sub>** semble même être plus actif que la première génération de dimères fonctionnalisés en **7 $\alpha$** , ce qui témoigne du fait que la position **17 $\alpha$**  est un site de fonctionnalisation intéressant. Ces composés pourraient éventuellement mener à la co-cristallisation du site actif de ce cytochrome.

En conclusion, les travaux de recherche présentés dans ce mémoire démontrent que la stratégie de dimérisation est une avenue intéressante dans l'élaboration de composés médicamenteux possédant des actions biologiques spécifiques. Dans le cas des dimères d'androgènes, ce sont le site de fonctionnalisation, la rigidité du connecteur moléculaire, sa taille et la compatibilité des composés avec les conditions biologiques qui semblent être les facteurs principaux déterminant le potentiel thérapeutique des dimères. Avec ces constats, les découvertes engendrées par ce travail et la recherche préalable dans ce domaine, il sera possible dans le futur de se baser sur des fondements théoriques solides afin de concevoir des dimères encore plus intéressants. Dans l'avenir, il serait pertinent de fabriquer des dimères possédant des connecteurs moléculaires pouvant faire des ponts hydrogènes. Des connecteurs moléculaires contenant des hétérocycles, comme le motif 1,2,3-triazole, pourraient être très intéressants, car ces fonctionnalités peuvent grandement faire varier le métabolisme d'une drogue ainsi que son profil pharmacocinétique. Bien que les dimères présentés dans ce mémoire soient très attrayants, les connecteurs moléculaires faits uniquement

de chaînes de carbone pourraient éventuellement nuire à l'absorption et à la distribution des composés dans l'organisme. Dans un souci d'applicabilité médicale, des designs alternatifs devraient être testés, sans toutefois perdre de vue les avantages offerts par les nouveaux composés rapportés dans ce mémoire.

En somme, on ne peut qu'espérer que le fruit du labeur des gens qui ont travaillé sur ces questions de recherches mènera éventuellement à la commercialisation de solutions hormonothérapeutiques efficaces et spécifiques contre le cancer de la prostate, un réel fléau de notre époque.

## ANNEXE A

### PARTIE EXPÉRIMENTALE

#### A.1 Remarques générales

Les produits achetés commercialement ont été utilisés sans purification. Les solvants ont été utilisés directement ou ont été préalablement distillés et séchés selon les méthodes standards [126]. Les réactions anhydres ont été réalisées sous atmosphère d'azote avec de la verrerie séchée au bec Bunsen. Les parachèvements des réactions ont été réalisés au moyen d'extractions aqueuses. Les phases organiques furent séchées sur du sulfate de magnésium anhydre, filtrées et les solvant furent évaporées par un évaporateur rotatif et par une pompe sous pression réduite.

Le suivi des réactions a été effectué par chromatographie sur couche mince (CCM). Les chromatographies ont été réalisées sur des plaques en verre recouvertes d'une couche de 0,25 mm d'épaisseur de gel de silice (Sigma T 6145, 60 Å). À la suite de l'élution, les plaques ont été révélées à l'aide d'une lampe à rayonnement ultraviolet (UV) et d'une solution aqueuse contenant 5% d'acide phosphomolybdique (PMA), 6% d'acide sulfurique concentrée et 0,2% de molybdate de cérium et d'ammonium. Les purifications des composés ont été effectuées par chromatographie éclair sur colonne selon la méthode de Still *et al.* [127]. La phase stationnaire fut constituée d'un gel de silice de maille 40-63 microns et tous les solvants utilisés pour l'élution ont été préalablement distillés avant leur utilisation.

Les molécules synthétisées ont été analysées par spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN). Les spectres de proton (RMN  $^1\text{H}$ ) et de carbone (RMN  $^{13}\text{C}$ ) ont été obtenus à l'aide d'un appareil RMN Varian 200 MHz et d'un appareil RMN Bruker Neo Avance 400 MHz. Les échantillons ont été dissous dans le chloroforme deutéré ( $\text{CDCl}_3$ ). Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) des différents signaux sont exprimés en ppm par rapport au déplacement théorique du tétraméthylsilane (TMS). La multiplicité des signaux est exprimée par les abréviations suivantes : s (singulet), sl (singulet large), d (doublet), dd (doublet de doublet), dt (doublet de triplet), t (triplet), q (quadruplet) et m (multiplet).

Les spectres infrarouges (IR) des molécules ont été obtenus avec un spectrophotomètre Nicolet Impact 420 FT-IR en déposant les produits directement sur la pointe de diamant du spectrophotomètre. Les bandes d'absorption sont exprimées en  $\text{cm}^{-1}$ .

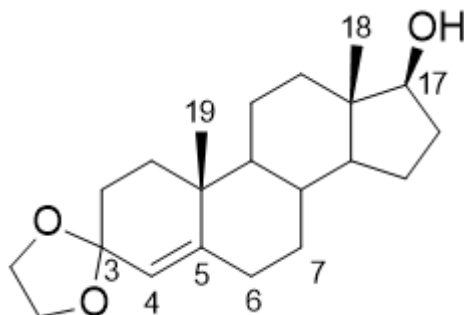
Les points de fusion ont été mesurés avec un appareil de type Electrothermal IA9100 et n'ont pas été corrigés. Les valeurs sont exprimées en degré Celsius.

Les analyses de masse de haute résolution des molécules ont été réalisées avec un spectromètre de masse Time-of-Flight Agilent 6210 (Agilent Technologies, CA, USA) utilisant une source electrospray en mode positif. Entre 5 à 20 microlitres ont été infusés dans la source d'ions. Avant les analyses, le spectromètre de masse a été étalonné avec un standard du manufacturier couvrant la plage de masse d'intérêt.

## A.2 Protocoles expérimentaux

Il est à noter que les protocoles et les caractérisations des molécules **13**, **13 $\alpha$** , **13 $\beta$** , **14**, **14 $\alpha$** , **14 $\beta$**  et **15** du chapitre IV sont répertoriés dans ce chapitre et sont rapportés tel que publiés. Toutes les informations rapportées dans cette annexe concernent les molécules du chapitre V.

### Synthèse de l'androst-4-èn-17 $\beta$ -ol spiro-(1,3)dioxolane (1)



La testostérone (3,80 g, 13,2 mmol) fut dissoute dans le benzène (40 mL), puis de l'éthylène glycol (1,8 mL, 32,2 mmol) et de l'acide paratoluènesulfonique (136,0 mg, 0,79 mmol) furent ajoutés. Le ballon réactionnel fut surmonté d'un appareil Dean-Stark et la solution fut chauffée à reflux pendant 12 heures. Après un refroidissement à température pièce, le mélange réactionnel fut dilué dans l'éther (40 mL), transféré dans une ampoule à extraction puis lavé trois fois avec de l'eau (3 x 30 mL). La phase organique fut séchée sur du sulfate de magnésium anhydre, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le produit brut fut purifié par chromatographie éclair (hexane/acétone, 90/10) afin de donner 1,90 g (43%) de produit pur.

43% (1,90 g), solide blanc léger

**Point de fusion:** 156 - 157°C

**IR  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>):** 3224 (O-H), 1252 (C-O), 1098 (C-O).

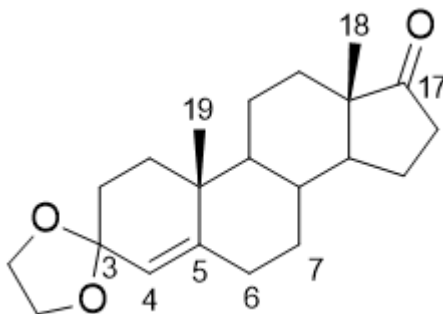
**<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm):** 5,36 – 5,33, (1H, m, 4-CH), 3,94 (4H, s, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3,64 (1H, t, J=8,6 Hz, 17-CH), 2,61 – 2,53 (1H, m, 2-CH<sub>2</sub> ax.), 1,04 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 0,76 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm):** 140,2 (C-4), 121,9 (C-5), 109,4 (C-3), 81,9 (C-17), 64,4, 64,2 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 51,3, 49,8, 42,7, 41,8, 36,7, 36,6, 36,3, 32,0, 31,3, 31,0, 30,5, 23,4, 20,6, 18,9, 11,0.

**SMRH (ESI+):** (M+H)<sup>+</sup> calculée pour C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>O<sub>3</sub> = 332,2351; masse trouvée = 332,2353.



### Synthèse de l'androst-4-èn-17-one spiro-(1,3)dioxolane (2)



Le cétal **1** (1,19 g, 3,58 mmol) fut dissout dans le dichlorométhane (15 mL) et traité avec du chlorochromate de pyridinium (1,86 g, 8,62 mmol) et de l'alumine (5,79 g, 56,76 mmol). Le mélange réactionnel fut agité à température pièce pendant 3 heures. Ensuite, la solution fut filtrée sur un gel de silice avec du dichlorométhane comme éluant (130 mL). La phase organique fut ensuite séchée, filtrée et évaporée afin de générer 1,125 g (95%) du produit oxydé **2**.

95% (1,125 g), solide blanc poudreux

**Point de fusion:** 181 - 183°C

**IR  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>):** 1736 (C=O), 1092 (C-O).

**<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm):** 5,28 – 5,38<sub>C-B</sub>, (1H, m, 4-CH), 3,93 (4H, s, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 2,61 – 2,38 (2H, m, 2-CH<sub>2</sub> ax., 16-CH<sub>2</sub> pseudo-ax.), 1,04 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 0,87 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>).

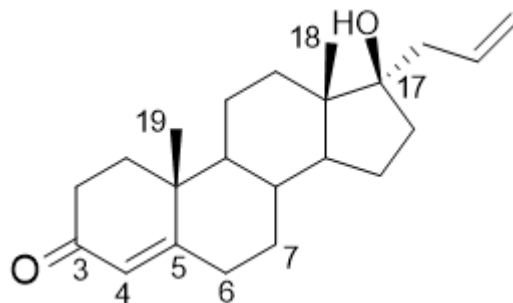
**<sup>13</sup>C NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm):** 221,1 (C-17), 140,4 (C-4), 121,4 (C-5), 109,3 (C-3), 64,4, 64,2 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 51,7, 49,8, 47,5, 41,8, 36,7, 36,2, 35,8, 31,5, 31,4, 31,0, 30,6, 21,9, 20,3, 18,9, 13,5.

**SMRH (ESI+):** (M+H)<sup>+</sup> calculée pour C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>3</sub> = 330,2195; masse trouvée = 330,2194.

**Procédure générale pour la réaction de Grignard et la déprotection du cétal (3<sub>1-6</sub>)**

Le stéroïde oxydé **2** (1,0 éq.) fut dissout dans du THF fraîchement distillé sous atmosphère inerte et le ballon réactionnel fut placé dans un bain de glace. Parallèlement, des granules de magnésium (3,5 éq.) furent immergées dans de l'éther diéthylique sec dans un ballon à deux cols surmontés par un condensateur et le montage est purgé à l'azote. Le bromure allylique (3,5 éq.) fut ensuite ajouté au mélange sous agitation rapide. Après approximativement 2 minutes d'agitation, la solution commence à bouillir. Une fois que le reflux a cessé et que les granules de magnésium ont disparues, le mélange fut transféré au ballon contenant le stéroïde **2** à l'aide d'une seringue. La solution fut agitée à 0°C pendant 30 minutes puis à température pièce pendant 1 h. Ensuite, le mélange réactionnel fut dilué dans de l'éther diéthylique, transféré dans une ampoule à extraction puis lavé une fois avec une solution de HCl 10% et trois fois avec de l'eau. La phase organique fut ensuite séchée avec du sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le produit brut fut ensuite dissout dans un mélange 2:1 de THF et d'une solution aqueuse de HCl 10%. La solution fut agitée pendant 16 h avant d'être diluée avec de l'éther diéthylique, transférée dans une ampoule à extraction puis lavée trois fois avec de l'eau. La phase organique fut ensuite séchée avec du sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le produit brut fut purifié par chromatographie sur colonne (hexane/acétone, 90/10). Le rendement moyen de la réaction est de 20%.

**Caractérisation du 17 $\alpha$ -allyl-androst-4-èn-3-one-17 $\beta$ -ol (3<sub>1</sub>)**



74%, solide blanc poudreux

**Point de fusion:** 53 - 55°C

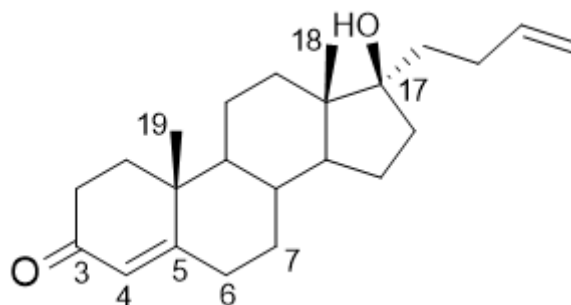
**IR v (cm<sup>-1</sup>):** 3440 (O-H), 1662 (C=O énone), 1614 (C=C), 1231 (C-O).

**<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 6,04 – 5,90 (1H, m, CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 5,72 (1H, s, 4-CH), 5,22 – 5,10 (2H, m, CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 1,20 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 0,93 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 199,5 (C-3), 171,2 (C-5), 134,6 (CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 123,9 (C-4), 119,4 (CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 82,2 (C-17), 53,7, 50,0, 46,0, 41,7, 38,7, 36,4, 35,8, 34,9, 34,0, 32,8, 31,7, 31,6, 23,7, 20,7, 17,4, 14,3.

**SMRH (ESI+):** (M+H)<sup>+</sup> calculée pour C<sub>22</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub> = 328,2402; masse trouvée = 328,2404.

**Caractérisation du 17 $\alpha$ -(but-3-èn-1-yl)-androst-4-èn-3-one-17 $\beta$ -ol (3<sub>2</sub>)**



6%, huile transparente

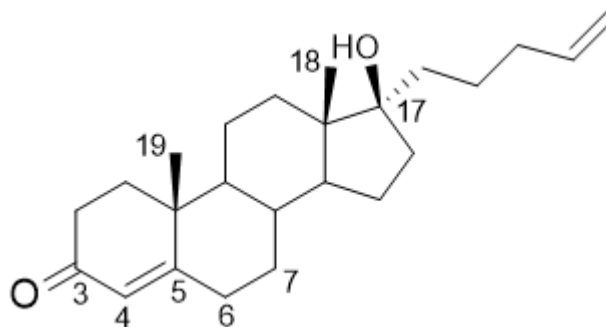
**IR v (cm<sup>-1</sup>):** 3450 (O-H), 1662 (C=O énone), 1614 (C=C), 1230 (C-O).

**<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 5,94 – 5,72 (1H, m, CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 5,72 (1H, s, 4-CH), 5,10 – 4,92 (2H, m, CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 1,19 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 0,91 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 199,5 (C-3), 171,2 (C-5), 139,4 (CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 123,9 (C-4), 114,4 (CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 83,2 (C-17), 53,8, 49,9, 46,3, 38,7, 36,5, 35,9, 35,7, 34,3, 34,0, 32,8, 31,7, 31,3, 28,1, 23,7, 20,7, 17,4, 14,3.

**SMRH (ESI+):** (M+H)<sup>+</sup> calculée pour C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub> = 342,2559; masse trouvée = 342,2560.

**Caractérisation du 17 $\alpha$ -(pent-4-èn-1-yl)-androst-4-èn-3-one-17 $\beta$ -ol (3<sub>3</sub>)**



10%, huile transparente

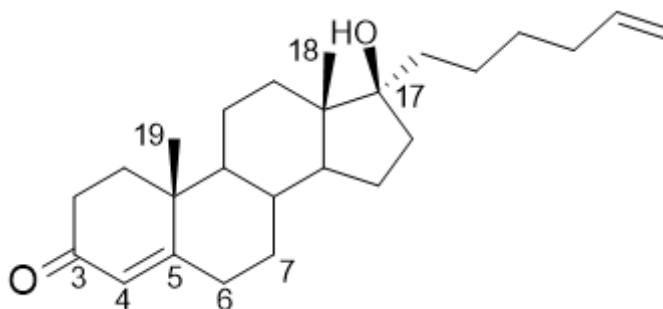
**IR v (cm<sup>-1</sup>):** 3453 (O-H), 1661 (C=O énone), 1614 (C=C), 1230 (C-O).

**<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm):** 5,92 – 5,72 (1H, m, CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 5,72 (1H, s, 4-CH), 5,06 – 4,93 (2H, m, CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 1,19 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 0,91 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm):** 199,6 (C-3), 171,3 (C-5), 138,8 (CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 123,9 (C-4), 114,6 (CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 83,2 (C-17), 53,7, 49,9, 46,3, 38,7, 36,5, 36,1, 35,7, 34,4, 34,3, 34,0, 32,8, 31,7, 31,3, 23,6, 22,9, 20,7, 17,4, 14,3.

**SMRH (ESI+):** (M+H)<sup>+</sup> calculée pour C<sub>24</sub>H<sub>36</sub>O<sub>2</sub> = 356,2715; masse trouvée = 356,2716.

**Caractérisation du 17 $\alpha$ -(hex-5-èn-1-yl)-androst-4-èn-3-one-17 $\beta$ -ol (3<sub>4</sub>)**



10%, huile transparente

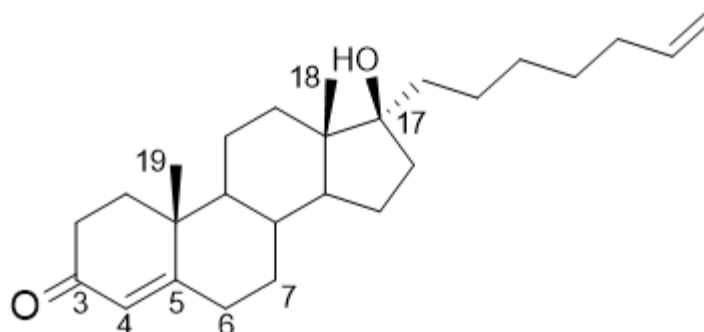
**IR v (cm<sup>-1</sup>):** 3441 (O-H), 1663 (C=O énone), 1615 (C=C), 1231 (C-O).

**<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 5,88 – 5,72 (1H, m, CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 5,72 (1H, s, 4-CH), 5,05 – 4,90 (2H, m, CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 1,19 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 0,90 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 199,6 (C-3), 171,3 (C-5), 138,9 (CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 123,8 (C-4), 114,4 (CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 83,3 (C-17), 53,8, 49,9, 46,2, 38,7, 36,5, 35,7, 34,3, 34,0, 33,9, 32,9, 31,8, 31,6, 31,3, 29,7, 23,6, 23,1, 20,7, 17,4, 14,4.

**SMRH (ESI+):** (M+H)<sup>+</sup> calculée pour C<sub>25</sub>H<sub>38</sub>O<sub>2</sub> = 370,2872; masse trouvée = 370,2879.

**Caractérisation du 17 $\alpha$ -(hept-6-èn-1-yl)-androst-4-èn-3-one-17 $\beta$ -ol (3<sub>5</sub>)**



11%, huile transparente

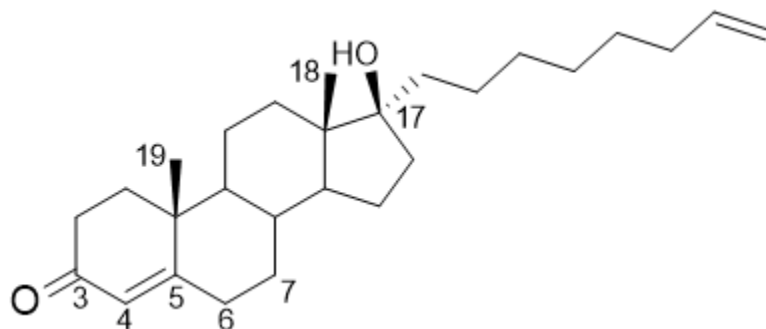
**IR v (cm<sup>-1</sup>):** 3447 (O-H), 1672 (C=O énone), 1615 (C=C), 1231 (C-O).

**<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 5,91 – 5,71 (1H, m, CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 5,72 (1H, s, 4-CH), 5,05 – 4,90 (2H, m, CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 1,20 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 0,91 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 199,6 (C-3), 171,3 (C-5), 139,1 (CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 123,8 (C-4), 114,2 (CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 83,3 (C-17), 53,8, 49,9, 46,2, 38,7, 36,7, 36,5, 35,7, 34,3, 34,0, 33,8, 32,9, 31,8, 31,3, 30,0, 29,0, 23,6, 23,4, 20,7, 17,4, 14,4.

**SMRH (ESI+):** (M+H)<sup>+</sup> calculée pour C<sub>26</sub>H<sub>40</sub>O<sub>2</sub> = 384,3028; masse trouvée = 384,3032.

**Caractérisation du 17 $\alpha$ -(oct-7-èn-1-yl)-androst-4-èn-3-one-17 $\beta$ -ol (3<sub>6</sub>)**



6%, huile transparente

**IR v (cm<sup>-1</sup>):** 3454 (O-H), 1672 (C=O énone), 1616 (C=C), 1231 (C-O).

**<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 5,87 – 5,70 (1H, m, CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 5,71 (1H, s, 4-CH), 5,04 – 4,89 (2H, m, CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 1,19 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 0,90 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 199,6 (C-3), 171,3 (C-5), 138,2 (CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 123,8 (C-4), 114,2 (CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 83,3 (C-17), 53,8, 49,9, 46,2, 38,7, 36,7, 35,7, 34,3, 34,0, 33,8, 32,9, 31,4, 30,3, 29,2, 28,9, 27,8, 27,0, 25,6, 23,5, 20,7, 17,5, 14,4.

**SMRH (ESI+):** (M+H)<sup>+</sup> calculée pour C<sub>27</sub>H<sub>42</sub>O<sub>2</sub> = 398,3185; masse trouvée = 398,3184.



### Procédure alternative pour la préparation du composé **3<sub>3</sub>**

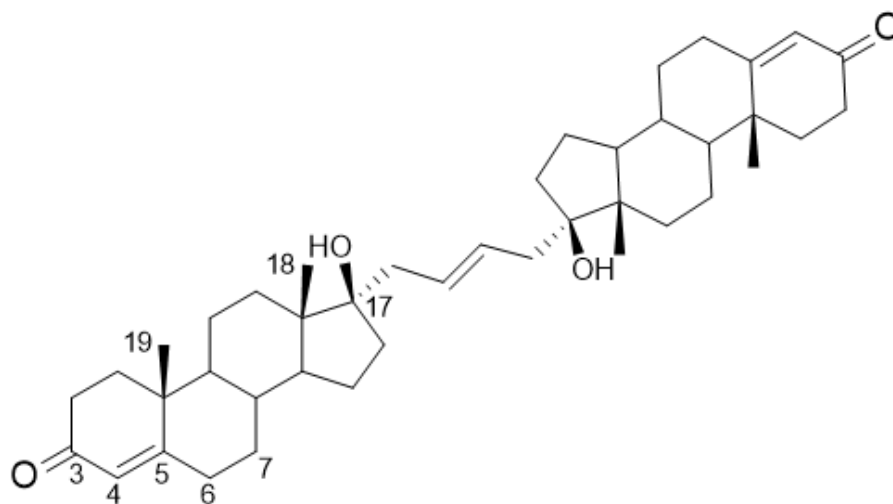
Le stéroïde **3** (50 mg, 0,15 mmol) fut dissout dans du THF fraîchement distillé (0,5 mL) sous atmosphère inerte et refroidi à -40°C dans un bain d'acétone et d'azote liquide. Parallèlement, des morceaux de lithium métallique (5 mg, 0,76 mmol) furent placés dans un ballon et immergés dans de l'éther diéthylique sec (0,5 mL). Le mélange fut agité et amené à 0°C à l'aide d'un bain de glace. Du 5-bromopentène (0,05 mL, 0,46 mmol) fut dilué dans 0,2 mL d'éther diéthylique sec et cette solution fut ajoutée goutte-à-goutte au ballon contenant le lithium. Après deux heures sous agitation, la solution d'organolithien fut transférée rapidement à la solution de stéroïde au moyen d'une seringue. Le mélange fut agité à -40°C pendant 30 minutes et fut ensuite ramené à température pièce. Ensuite, le mélange réactionnel fut dilué dans de l'éther diéthylique (20 mL), transféré dans une ampoule à extraction et lavé une fois avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (15 mL) et trois fois avec de l'eau (15 mL). La phase organique fut ensuite séchée avec du sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le produit brut fut dissout dans du THF (2 mL) auquel fut ajoutée une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (1 mL). Le mélange fut agité pendant 16 heures avant d'être dilué avec de l'éther diéthylique (20 mL), transféré dans une ampoule à extraction et lavé trois fois avec de l'eau (15 mL). La phase organique fut ensuite séchée avec du sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le produit brut fut purifié par chromatographie éclair (hexane/acétone, 90/10) afin d'obtenir le produit **4<sub>3</sub>** avec un rendement de 38%.

### **Procédure générale pour la préparation des dimères d'androgènes (4<sub>1-6</sub>)**

Le précurseur de testostérone 17 $\alpha$ - $\omega$ -alcényl pertinent fut dissout dans du dichlorométhane sec. Sous atmosphère d'azote, une solution de catalyseur d'Hoveyda-Grubbs 2<sup>ème</sup> génération (10% mol) dans le dichlorométhane fut ajoutée au mélange réactionnel. La solution fut agitée pendant 48 h à l'abris de la lumière. L'atmosphère d'azote fut constamment purgée lors des deux premières heures de la réaction et du dichlorométhane fut ajouté afin de maintenir le niveau du solvant. Après les deux premières heures, le milieu réactionnel fut purgé à l'azote régulièrement tout au cours de la réaction. Ensuite, le solvant fut évaporé et le produit brut purifié immédiatement par chromatographie éclair (hexane/acétone, 85/15). Le rendement moyen de la réaction de dimérisation est de 39%.

NB. - Étant donné que les dimères 4<sub>2-6</sub> ont été isolés sous forme de mélange, aucun point de fusion n'est rapporté pour ces composés. Les pics décrits en RMN <sup>13</sup>C sont les principaux signaux.

**Caractérisation du ((*E*)-17,17'-(but-2-ène-1,4-diyl))bis(androst-4-èn-3-one-17β-ol) (4<sub>1</sub>)**



41%, solide blanc poudreux

**Point de fusion:** Décomposition à partir de 232°C

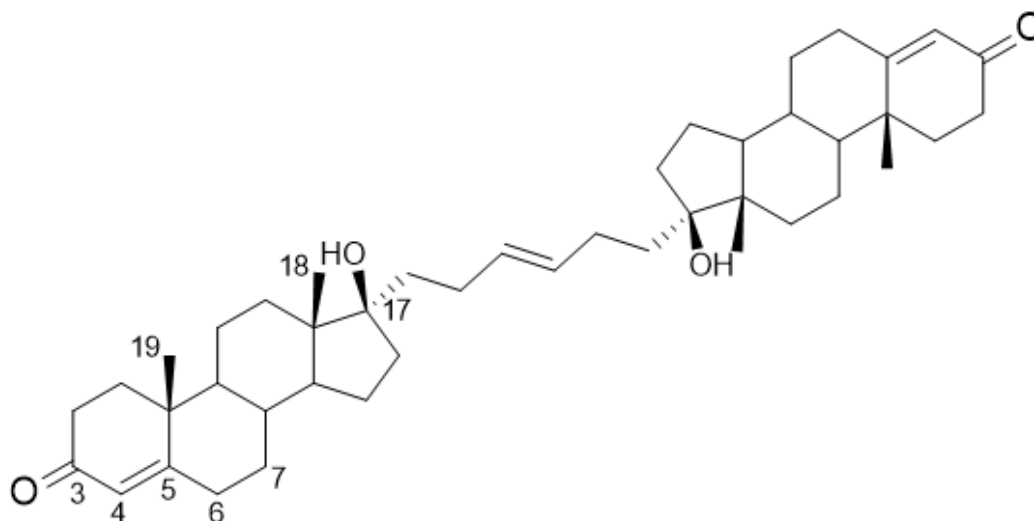
**IR  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>):** 3440 (O-H), 1661 (C=O), 1615 (C=C), 1231 (C-O).

**<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm):** 5,79 – 5,48 (4H, s large, 4,4'-CH et CH<sub>2</sub>-CH=CH-CH<sub>2</sub>), 1,20 (6H, s, 19,19'-CH<sub>3</sub>), 0,92 (6H, s, 18,18'-CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm):** 199,6 (C-3,3'), 171,2 (C-5,5'), 130,7 (CH<sub>2</sub>-CH=CH-CH<sub>2</sub>), 123,9 (C-4,4'), 82,4 (C-17,17'), 53,8, 50,1, 46,0, 40,5, 38,7, 36,4, 35,7, 35,0, 34,0, 32,8, 31,7, 31,6, 23,7, 20,7, 17,4, 14,4.

**SMRH (ESI+):** (M+H)<sup>+</sup> calculée pour C<sub>42</sub>H<sub>60</sub>O<sub>4</sub> = 628,4492; masse trouvée = 628,4491.

**Caractérisation du ((*E*)-17,17'-(hex-3-ène-1,6-diyl))bis(androst-4-èn-3-one-17β-ol) (4<sub>2</sub>)**



24%, solide blanc poudreux

**Point de fusion:** -

**IR v (cm<sup>-1</sup>):** 3433 (O-H), 1661 (C=O), 1615 (C=C), 1231 (C-O).

**<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 5,72 – 5,30 (4H, m, 4,4'-CH et CH<sub>2</sub>-CH=CH-CH<sub>2</sub>), 1,20 (6H, s, 19,19'-CH<sub>3</sub>), 0,92 (6H, s, 18,18'-CH<sub>3</sub>).

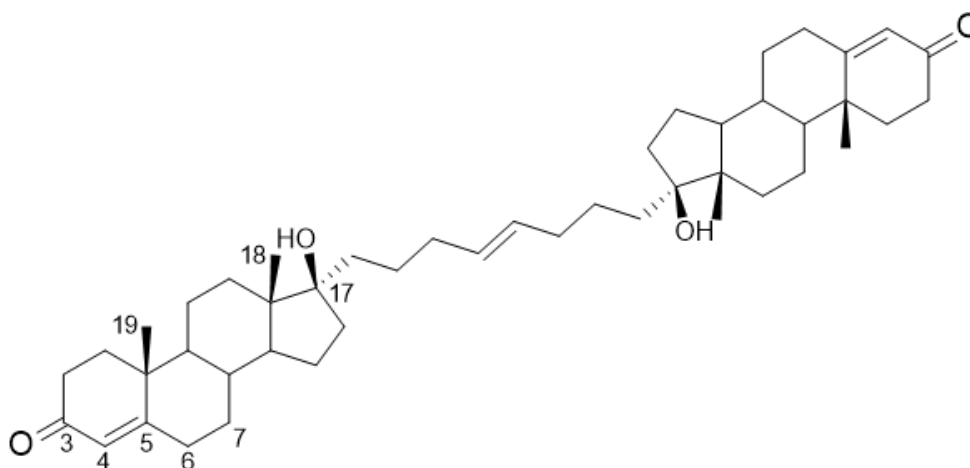
**<sup>13</sup>C NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 199,5 (C-3,3'), 171,1 (C-5,5'), 130,8 (CH<sub>2</sub>-CH=CH-CH<sub>2</sub>), 123,9 (C-4,4'), 82,4 (C-17,17'), 53,8, 50,0, 46,0, 40,5, 38,7, 36,4, 35,8, 35,0, 34,0, 32,8, 31,8, 31,6, 29,7, 23,7, 20,7, 17,4, 14,3.

**SMRH (ESI+):** (M+H)<sup>+</sup> calculée pour C<sub>44</sub>H<sub>64</sub>O<sub>4</sub> = 656,4805; masse trouvée = 656,4879.

Note: le composé fut isolé avec un analogue possédant la formule brute C<sub>43</sub>H<sub>62</sub>O<sub>4</sub> (642,4648 g/mol) et un analogue possédant la formule brute C<sub>42</sub>H<sub>60</sub>O<sub>4</sub> (628,4492 g/mol).

**Caractérisation du ((*E*)-17,17'-(oct-4-ène-1,8-diyl))bis(androst-4-èn-3-one-17β-ol)**

(43)



29%, solide blanc poudreux

**Point de fusion:** -

**IR v (cm<sup>-1</sup>):** 3442 (O-H), 1664 (C=O), 1615 (C=C), 1231 (C-O).

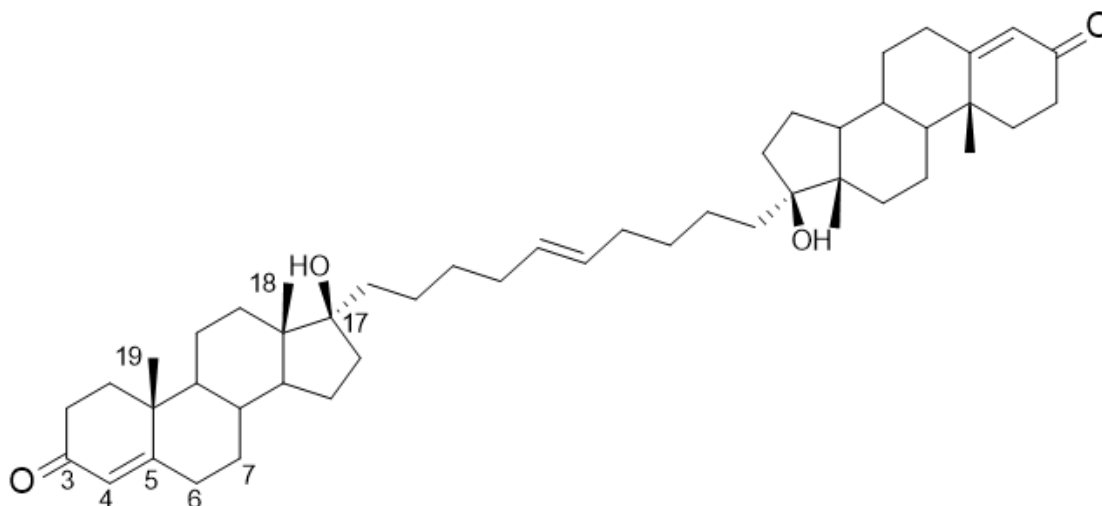
**<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 5,72 – 5,41 (4H, m, 4,4'-CH et CH<sub>2</sub>-CH=CH-CH<sub>2</sub>), 1,20 (6H, s, 19,19'-CH<sub>3</sub>), 0,90 (6H, s, 18,18'-CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 199,5 (C-3,3'), 171,2 (C-5,5'), 130,5 (CH<sub>2</sub>-CH=CH-CH<sub>2</sub>), 123,8 (C-4,4'), 83,2 (C-17,17'), 53,8, 50,0, 46,3, 38,7, 36,5, 36,2, 35,8, 34,3, 34,0, 32,8, 31,8, 31,3, 29,7, 23,7, 23,6, 20,7, 17,4, 14,3.

**SMRH (ESI+):** (M+H)<sup>+</sup> calculée pour C<sub>46</sub>H<sub>68</sub>O<sub>4</sub> = 684,5188; masse trouvée = 684,5188.

Note: le composé fut isolé avec un analogue possédant la formule brute C<sub>45</sub>H<sub>66</sub>O<sub>4</sub> (670,4960 g/mol) et un analogue possédant la formule brute C<sub>44</sub>H<sub>64</sub>O<sub>4</sub> (656,4803 g/mol).

**Caractérisation du ((E)-17,17'-(déca-5-ène-1,10-diyl))bis(androst-4-èn-3-one-17β-ol) (44)**



43%, solide blanc poudreux

**Point de fusion:** -

**IR v (cm<sup>-1</sup>):** 3440 (O-H), 1662 (C=O), 1615 (C=C), 1231 (C-O).

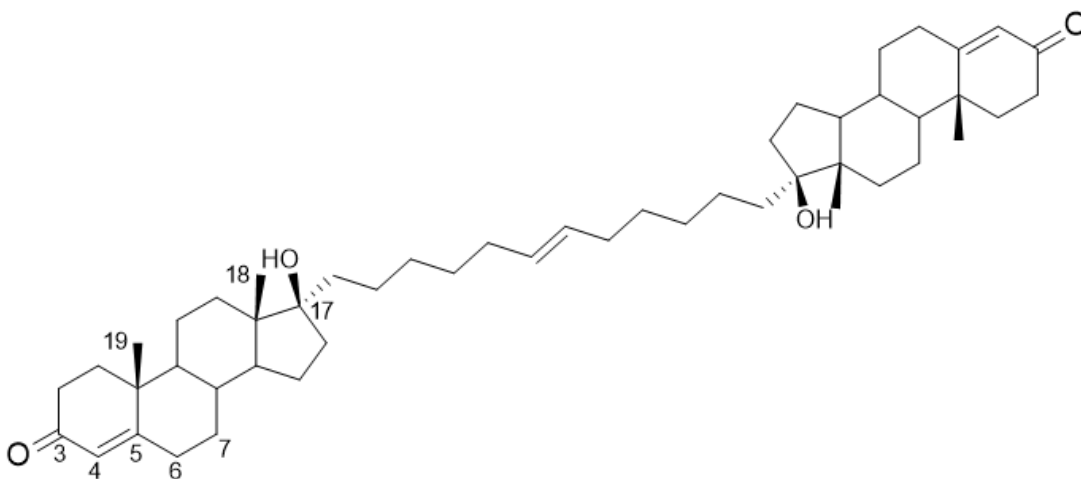
**<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 5,72 (2H, s, 4,4'-CH), 5,55 – 5,36 (2H, m, CH<sub>2</sub>-CH=CH-CH<sub>2</sub>), 1,19 (6H, s, 19,19'-CH<sub>3</sub>), 0,90 (6H, s, 18,18'-CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 199,6 (C-3,3'), 171,3 (C-5,5'), 130,4 (CH<sub>2</sub>-CH=CH-CH<sub>2</sub>), 123,8 (C-4,4'), 83,3 (C-17,17'), 53,8, 49,9, 46,2, 38,7, 36,5, 35,7, 34,2, 34,0, 32,8, 32,6, 31,8, 31,3, 30,3, 29,7, 23,6, 22,9, 20,7, 17,4, 14,4.

**SMRH (ESI+):** (M+H)<sup>+</sup> calculée pour C<sub>48</sub>H<sub>72</sub>O<sub>4</sub> = 712,5431; masse trouvée = 712,5426.

Note: le composé fut isolé avec un analogue possédant la formule brute C<sub>47</sub>H<sub>70</sub>O<sub>4</sub> (698,5266 g/mol) et un analogue possédant la formule brute C<sub>49</sub>H<sub>74</sub>O<sub>4</sub> (726,5577 g/mol).

**Caractérisation du ((*E*)-17,17'-(dodéca-6-ène-1,12-diyl))bis(androst-4-èn-3-one-17 $\beta$ -ol) (4<sub>5</sub>)**



47%, solide blanc poudreux

**Point de fusion:** -

**IR  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>):** 3441 (O-H), 1663 (C=O), 1615 (C=C), 1231 (C-O).

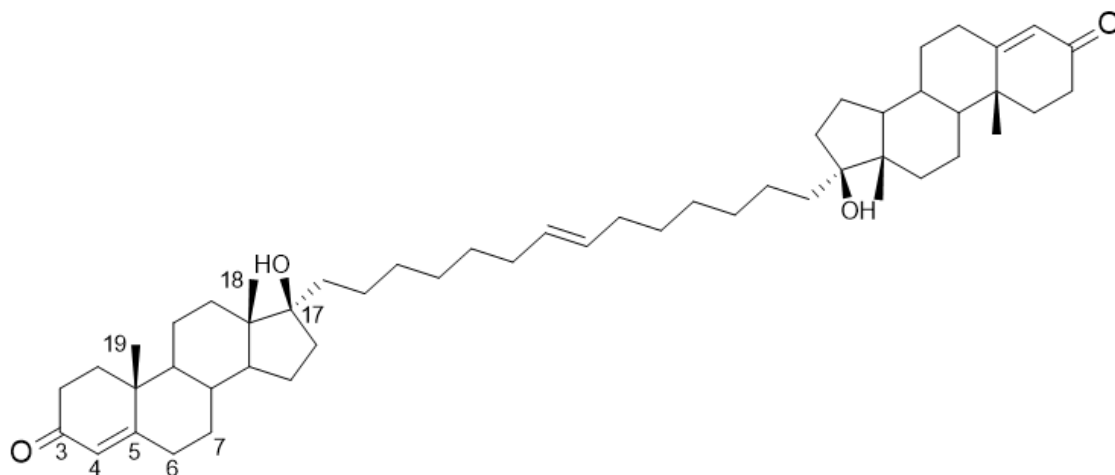
**<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm):** 5,72 (2H, s, 4,4'-CH), 5,40 – 5,36 (2H, m, CH<sub>2</sub>-CH=CH-CH<sub>2</sub>), 1,19 (6H, s, 19,19'-CH<sub>3</sub>), 0,90 (6H, s, 18,18'-CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm):** 199,6 (C-3,3'), 171,3 (C-5,5'), 130,3 (CH<sub>2</sub>-CH=CH-CH<sub>2</sub>), 123,8 (C-4,4'), 83,3 (C-17,17'), 53,8, 50,0, 46,2, 38,7, 36,7, 36,5, 35,7, 34,3, 34,0, 32,9, 32,6, 31,8, 31,3, 30,0, 29,7, 23,6, 23,4, 20,7, 17,4, 14,4.

**SMRH (ESI+):** (M+H)<sup>+</sup> calculée pour C<sub>50</sub>H<sub>76</sub>O<sub>4</sub> = 740,5744; masse trouvée = 740,5741.

Note: le composé fut isolé avec un analogue possédant la formule brute C<sub>49</sub>H<sub>74</sub>O<sub>4</sub> (726,5588 g/mol).

**Caractérisation du ((*E*)-17,17'-(tétradéca-7-ène-1,14-diyl))bis(androst-4-èn-3-one-17 $\beta$ -ol) (4<sub>6</sub>)**



50%, solide blanc poudreux

**Point de fusion:** -

**IR  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>):** 3435 (O-H), 1662 (C=O), 1615 (C=C), 1231 (C-O).

**<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm):** 5,72 (2H, s, 4,4'-CH), 5,41 – 5,36 (2H, s broad, CH<sub>2</sub>-CH=CH-CH<sub>2</sub>), 1,19 (6H, s, 19,19'-CH<sub>3</sub>), 0,90 (6H, s, 18,18'-CH<sub>3</sub>).

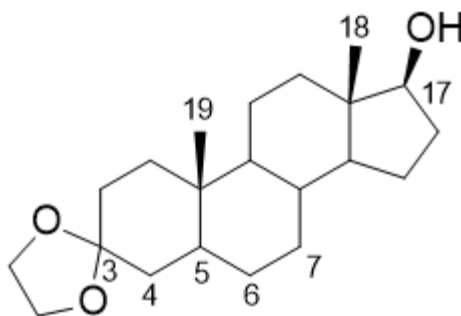
**<sup>13</sup>C NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm):** 199,6 (C-3,3'), 171,3 (C-5,5'), 130,3 (CH<sub>2</sub>-CH=CH-CH<sub>2</sub>), 123,8 (C-4,4'), 83,3 (C-17,17'), 53,8, 49,9, 46,2, 38,7, 36,7, 36,5, 35,7, 34,3, 34,0, 32,9, 32,6, 31,8, 31,3, 30,3, 30,0, 29,7, 23,6, 23,4, 20,7, 17,4, 14,4.

**SMRH (ESI+):** (M+H)<sup>+</sup> calculée pour C<sub>52</sub>H<sub>80</sub>O<sub>4</sub> = 768,6057; masse trouvée = 768,6025.

Note: le composé fut isolé avec un analogue possédant la formule brute C<sub>51</sub>H<sub>78</sub>O<sub>4</sub> (754,5898 g/mol) et un analogue possédant la formule brute C<sub>50</sub>H<sub>76</sub>O<sub>4</sub> (740,5738 g/mol).



### Préparation de l'androst-17 $\beta$ -ol spiro-(1,3)dioxolane (5)



Le protocole est le même que pour la préparation de l'androst-5-èn-17 $\beta$ -ol spiro-(1,3)dioxolane (1). Le produit brut fut purifié par chromatographie éclair (hexane/acétone, 90/10).

98%, solide blanc léger

**Point de fusion:** 158 - 159°C

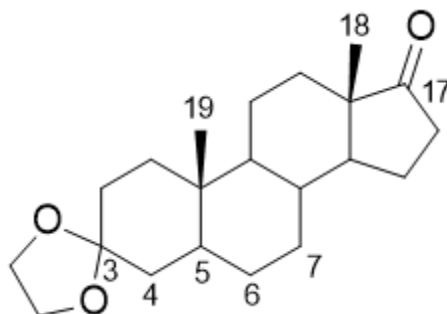
**IR  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>):** 3383 (O-H), 1258 (C-O), 1100 (C-O).

**<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm):** 3,93 (4H, s, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3,63 (1H, t, J=8,6 Hz, 17-CH), 2,13 – 2,02 (1H, m, 2-CH<sub>2</sub> ax.), 0,82 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 0,73 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm):** 109,4 (C-3), 82,0 (C-17), 64,15 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 54,2, 51,0, 43,8, 43,0, 38,0, 36,8, 36,1, 35,6, 35,5, 31,5, 31,2, 30,6, 28,5, 23,4, 20,8, 11,4, 11,2.

**SMRH (ESI+):** (M+H)<sup>+</sup> calculée pour C<sub>21</sub>H<sub>34</sub>O<sub>3</sub> = 334,2508; masse trouvée = 334,2493.

### Préparation de l'androst-17-one spiro-(1,3)dioxolane (6)



Le protocole est le même que pour la préparation de l'androst-5-èn-17-one spiro-(1,3)dioxolane (2).

93%, solide blanc poudreux

**Point de fusion:** 151 - 152°C

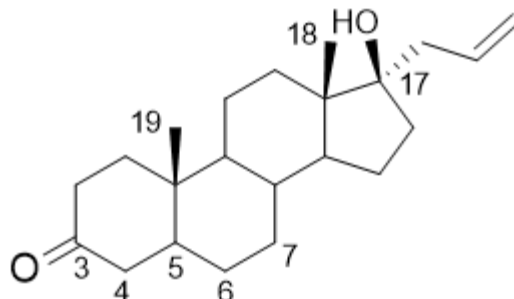
**IR  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>):** 1740 (C=O), 1096 (C-O).

**<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm):** 3,92 (4H, s, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 2,45 – 2,38 (1H, dd, J=19,2 Hz et 8,12 Hz, 16-CH<sub>2</sub> pseudo-ax.), 2,09 – 2,00 (1H, m, 4-CH<sub>2</sub> ax.), 0,84 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 0,82 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm):** 221,4 (C-17), 109,2 (C-3), 64,2 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 54,2, 51,4, 47,8, 43,7, 38,0, 36,0, 35,9, 35,7, 35,1, 31,6, 31,1, 30,8, 28,3, 21,8, 20,5, 13,8, 11,4.

**SMRH (ESI+):** (M+H)<sup>+</sup> calculée pour C<sub>23</sub>H<sub>33</sub>O<sub>2</sub> = 332,2351; masse trouvée = 332,2338.

### Préparation du 17 $\alpha$ -allyl-androst-3-one-17 $\beta$ -ol (7)



Ce composé fut préparé selon la procédure générale pour la réaction de Grignard et la déprotection du cétaol.

84%, solide blanc poudreux

**Point de fusion:** 117 - 118°C

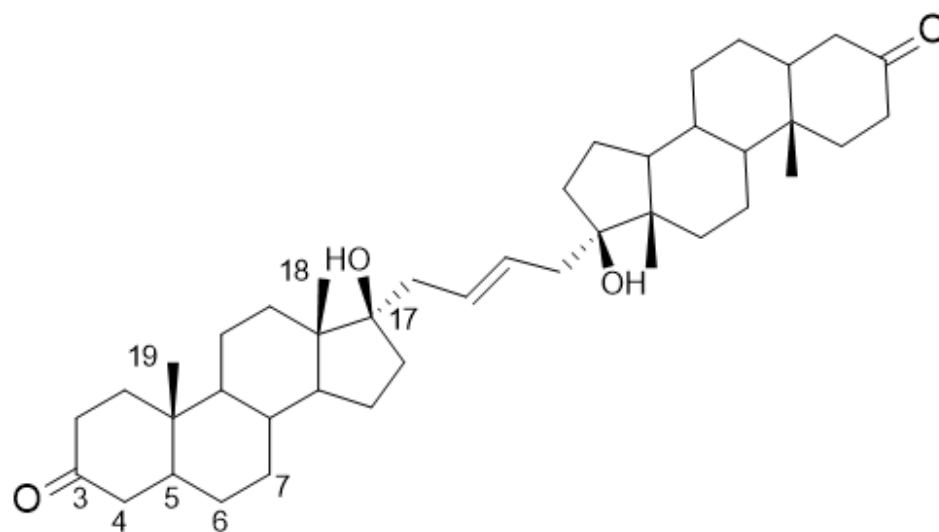
**IR  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>):** 3446 (O-H), 1701 (C=O cétone), 1645 (C=C), 1253 (C-O).

**<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm):** 6,04 – 5,90 (1H, m, CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 5,21 – 5,13 (2H, m, CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 1,03 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 0,91 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm):** 212,0 (C-3), 134,8 (CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 119,4 (CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 82,4 (C-17), 53,8, 50,4, 46,8, 46,3, 44,7, 41,8, 38,6, 38,2, 36,2, 35,8, 35,0, 31,8, 31,5, 28,9, 23,8, 21,1, 14,5, 11,5.

**SMRH (ESI+):** (M+H)<sup>+</sup> calculée pour C<sub>22</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub> = 330,2559; masse trouvée = 330,2545.

**Caractérisation du ((*E*)-17,17'-(but-2-ène-1,4-diyl))bis(androst-3-one-17 $\beta$ -ol) (8)**



Ce dimère fut préparé selon la procédure générale pour la préparation des dimères d'androgènes.

49%, solide blanc poudreux

**Point de fusion:** Décomposition à partir de 243°C

**IR  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>):** 3480 (O-H), 1709 (C=O), 1607 (C=C), 1221 (C-O).

**<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm):** 5,70 (2H, s, CH<sub>2</sub>-CH=CH-CH<sub>2</sub>), 1,03 (6H, s, 19,19'-CH<sub>3</sub>), 0,89 (6H, s, 18,18'-CH<sub>3</sub>).

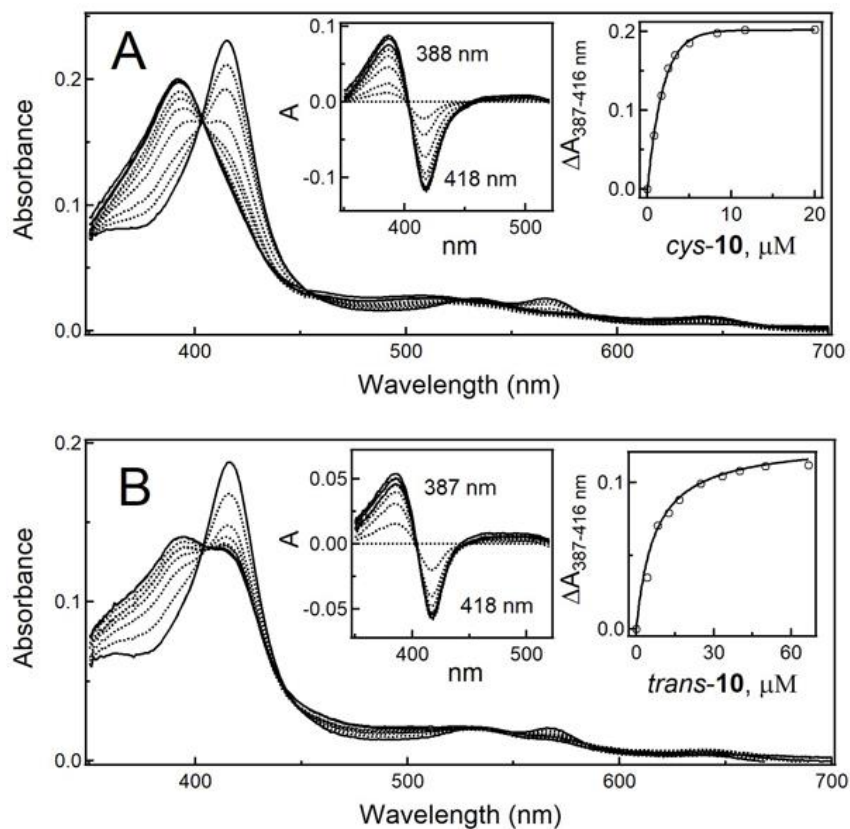
**<sup>13</sup>C NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm):** 212,0 (C-3,3'), 130,8 (CH<sub>2</sub>-CH=CH-CH<sub>2</sub>), 82,6 (C-17,17'), 53,8, 50,4, 46,8, 46,2, 44,7, 40,6, 38,6, 38,2, 36,2, 35,8, 35,1, 31,8, 31,5, 28,9, 23,8, 21,1, 14,5, 11,5.

**SMRH (ESI+):** (M+H)<sup>+</sup> calculée pour C<sub>42</sub>H<sub>64</sub>O<sub>4</sub> = 632,4805; masse trouvée = 632,4796.

## ANNEXE B1

### FIGURE S1, TABLE S1 et SPECTRES RMN $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$ DES COMPOSÉS DU CHAPITRE IV

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  sont présentés selon la numérotation respective des molécules contenues dans le corps du texte. La figure, la table et les spectres sont présentés tels que publiés dans le matériel supplémentaire de l'article *Innovative C<sub>2</sub>-symmetric testosterone and androstenedione dimers: Design, synthesis, biological evaluation on prostate cancer cell lines and binding study to recombinant*. La langue utilisée pour nommer les composés est celle de l'article d'origine. Les intermédiaires réactionnels menant à la synthèse des nouveaux composés sont connus et leurs spectres RMN sont déjà rapportés dans la littérature [128].



**Fig. S1:** **A** and **B**, Spectral changes in recombinant CYP3A4 induced by TS dimers *cis*-10 and *trans*-10, respectively. Absorbance spectra of 2  $\mu\text{M}$  CYP3A4 at different ligand concentrations were recorded in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, at room temperature. Left insets are the difference spectra; right insets are titration plots with quadratic (**A**) and hyperbolic (**B**) fitting. The derived  $K_d$  values are given in Table 2 of the main text.

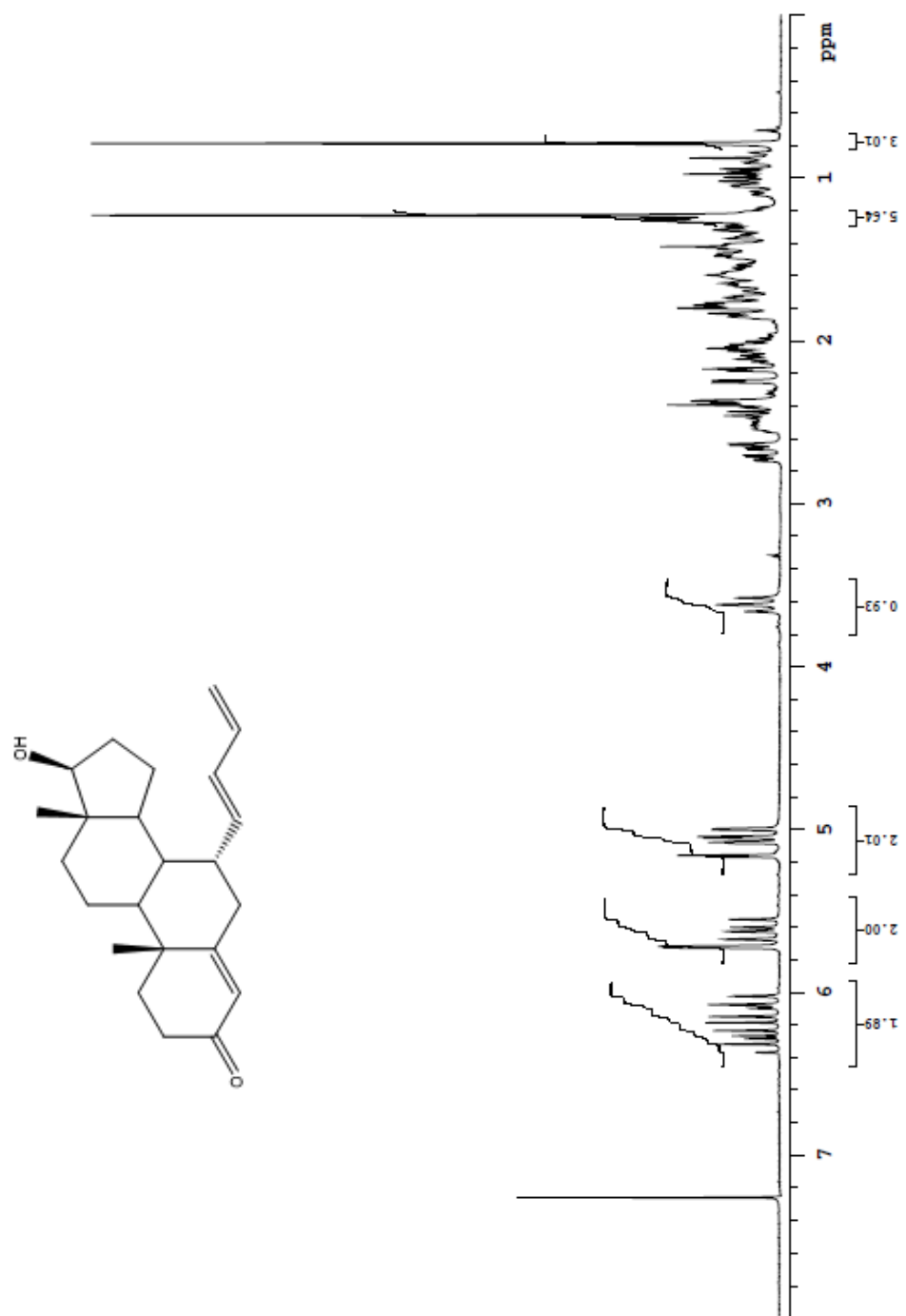
**Table S1.** X-ray data collection and refinement statistics for the *cis-10* bound CYP3A4

<i>Data statistics</i>	
Space group	I222
Unit cell parameters	$a = 78 \text{ \AA}$ , $b = 102 \text{ \AA}$ , $c = 128 \text{ \AA}$ ; $\alpha, \beta, \gamma = 90^\circ$
Molecules per asymmetric unit	1
Resolution range ( $\text{\AA}$ )	79.54 - 2.75 (2.90 – 2.75) <sup>a</sup>
Total reflections	77,987 (10741)
Unique reflections	13,107 (1895)
Redundancy	6.0 (5.7)
Completeness	97.3 (98.2)
Average $I/\sigma I$	6.9 (1.0)
$R_{\text{merge}}$	0.129 (1.839)
$R_{\text{pim}}$	0.057 (0.835)
CC $\frac{1}{2}$	0.994 (0.390)
<i>Refinement statistics</i>	
$R/R_{\text{free}}$ <sup>b</sup>	24.3/27.7
Number of atoms:	
Protein	3643
Solvent	0
R.m.s. deviations:	
Bond lengths, $\text{\AA}$	0.002
Bond angles, $^\circ$	0.576
Ramachandran plot <sup>c</sup> (residues; %)	
Preferred	410 (92.1%)
Allowed	33 (7.4%)
Outliers	2 (0.5%)

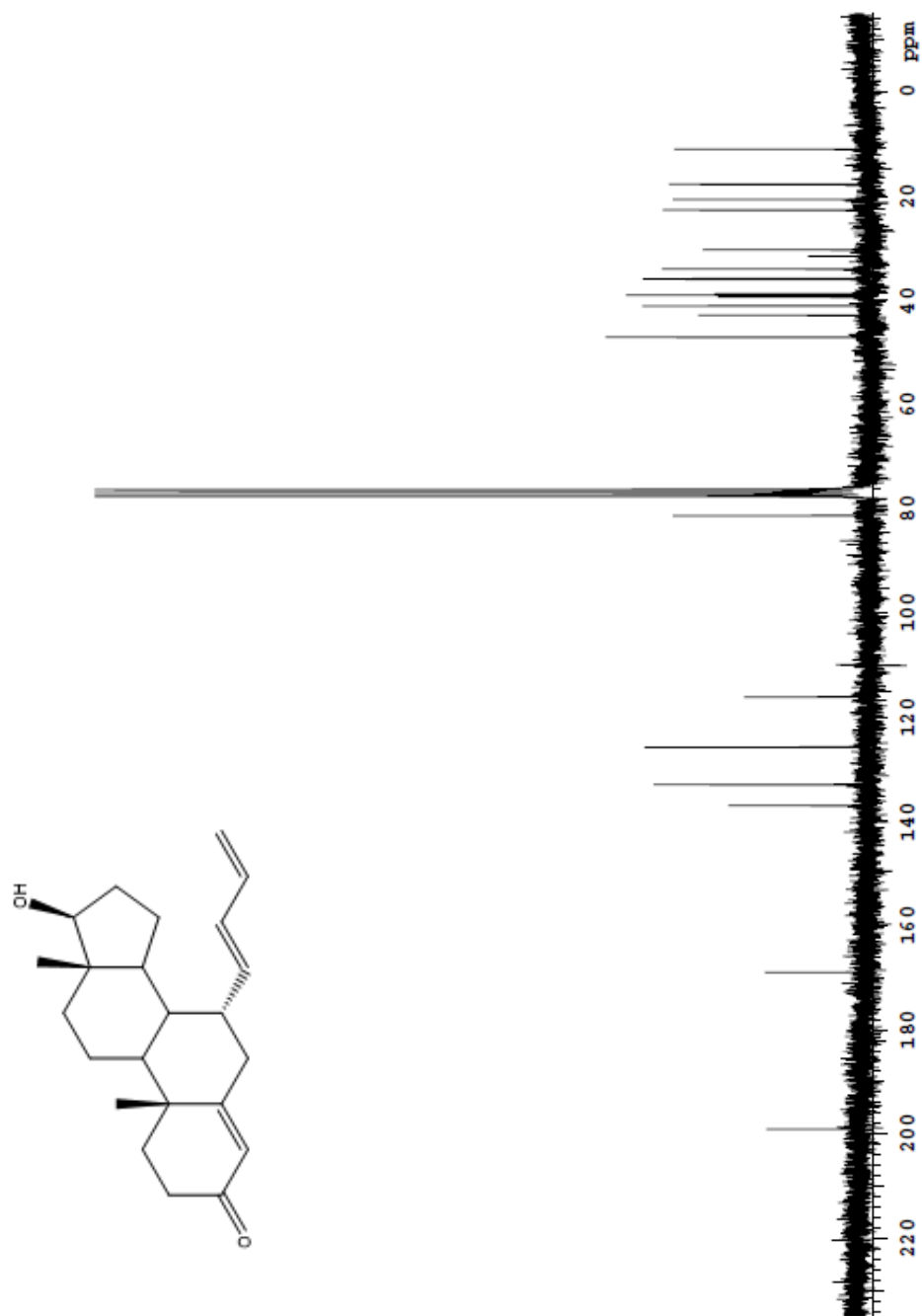
<sup>a</sup> Values in brackets are for the highest resolution shell.

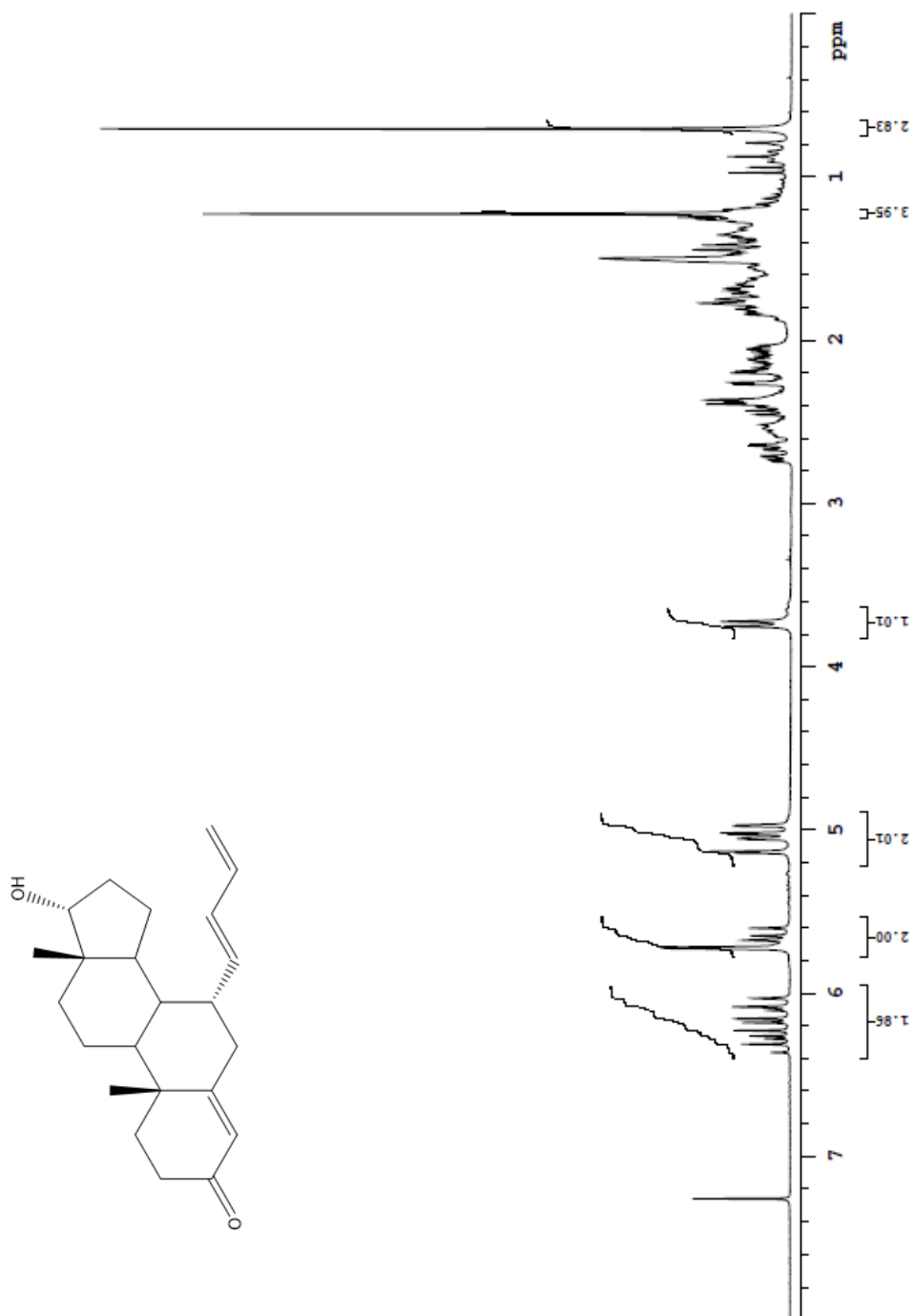
<sup>b</sup>  $R_{\text{free}}$  was calculated from a subset of 5% of the data that were excluded during refinement.

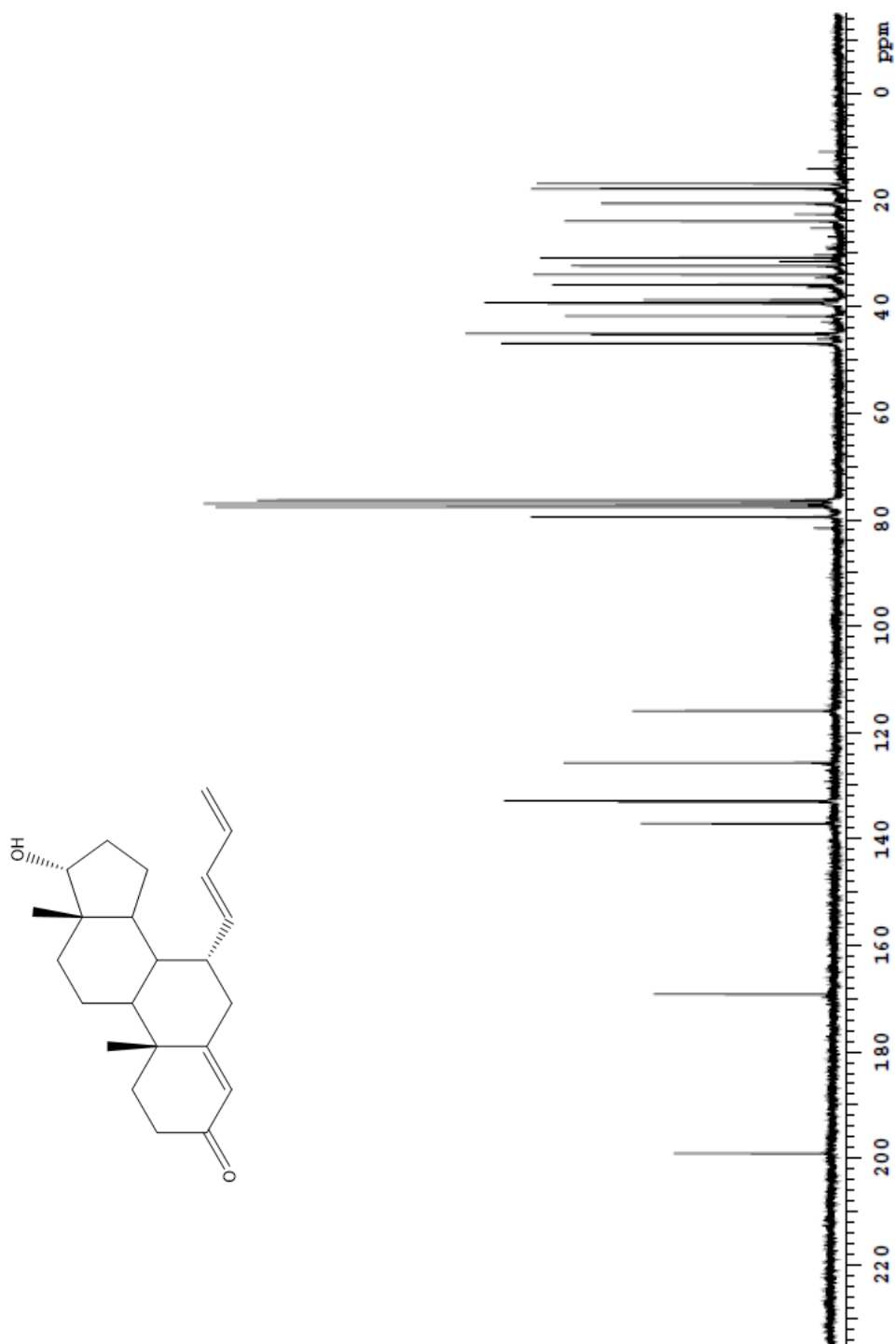
<sup>c</sup> Analyzed with PROCHECK.

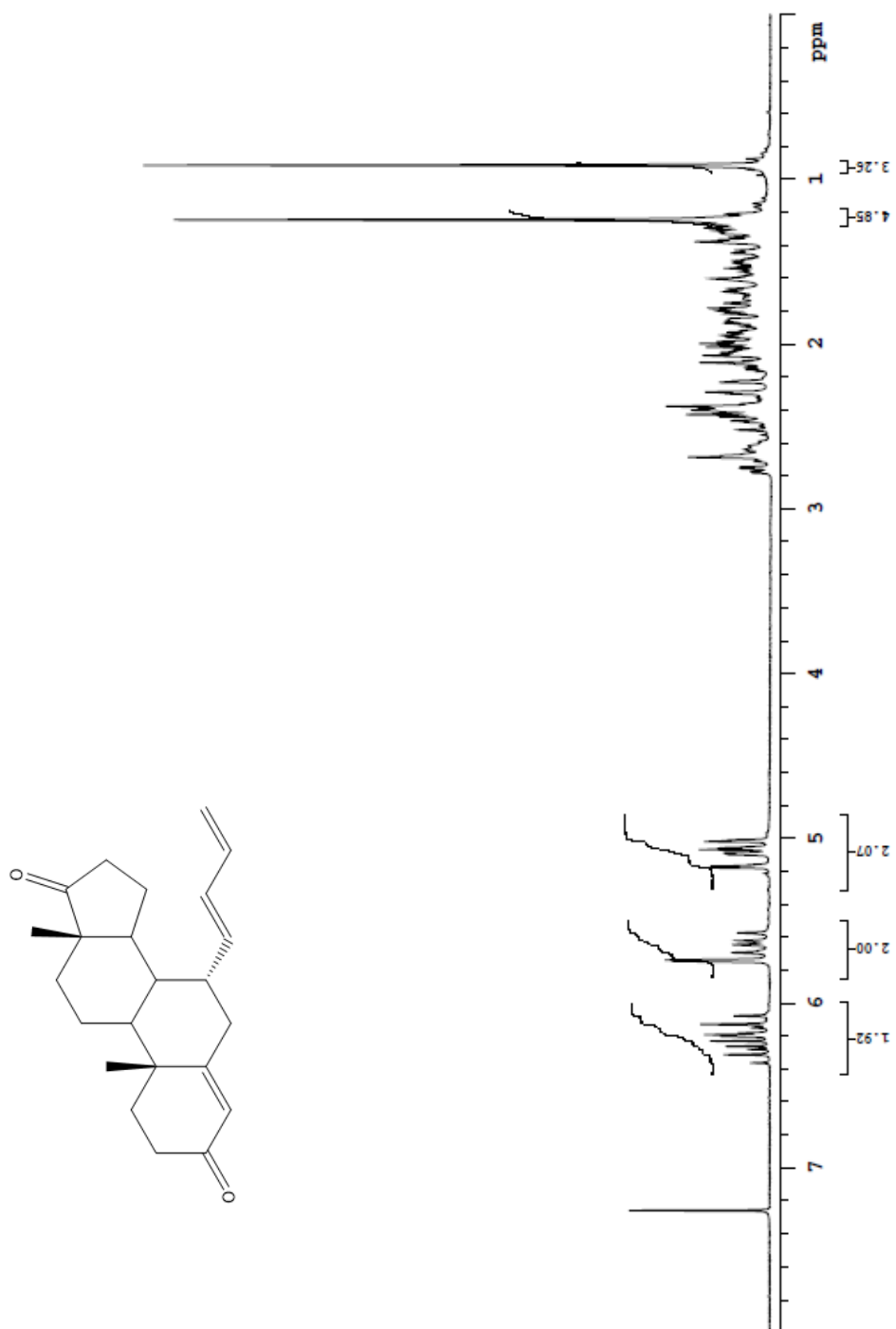
Spectre B1.1 RMN  $^1\text{H}$  du 7 $\alpha$ -(buta-1,3-dienyl)-4-androsten-17 $\beta$ -ol-3-one (13 $\beta$ )

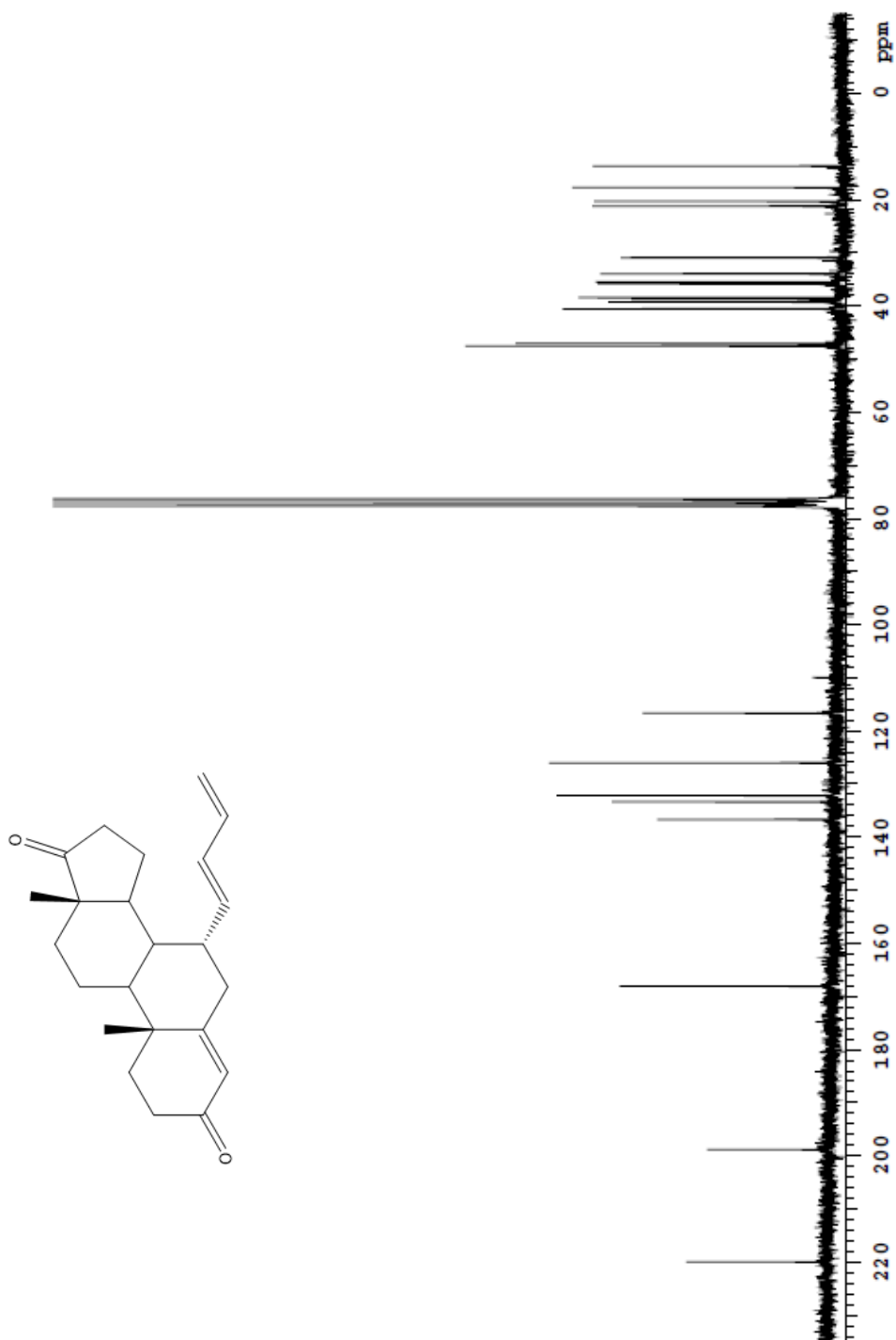


Spectre B1.2 RMN  $^{13}\text{C}$  du  $7\alpha$ -(buta-1,3-dienyl)-4-androsten-17 $\beta$ -ol-3-one (**13 $\beta$** )

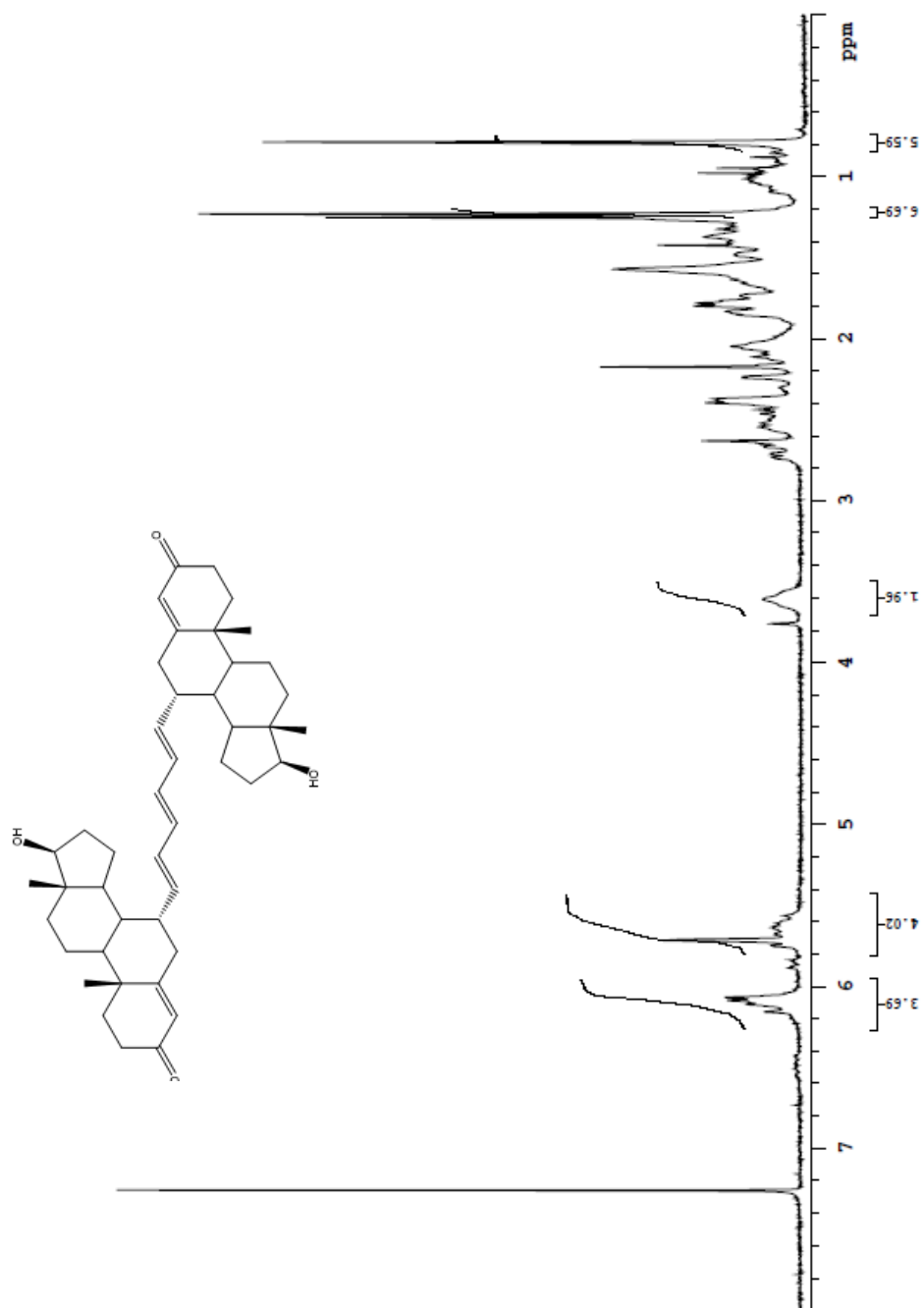
Spectre B1.3 RMN  $^1\text{H}$  du 7 $\alpha$ -(buta-1,3-dienyl)-4-androsten-17 $\alpha$ -ol-3-one (**13a**)

Spectre B1.4 RMN  $^{13}\text{C}$  du 7 $\alpha$ -(buta-1,3-dienyl)-4-androsten-17 $\alpha$ -ol-3-one (**13a**)

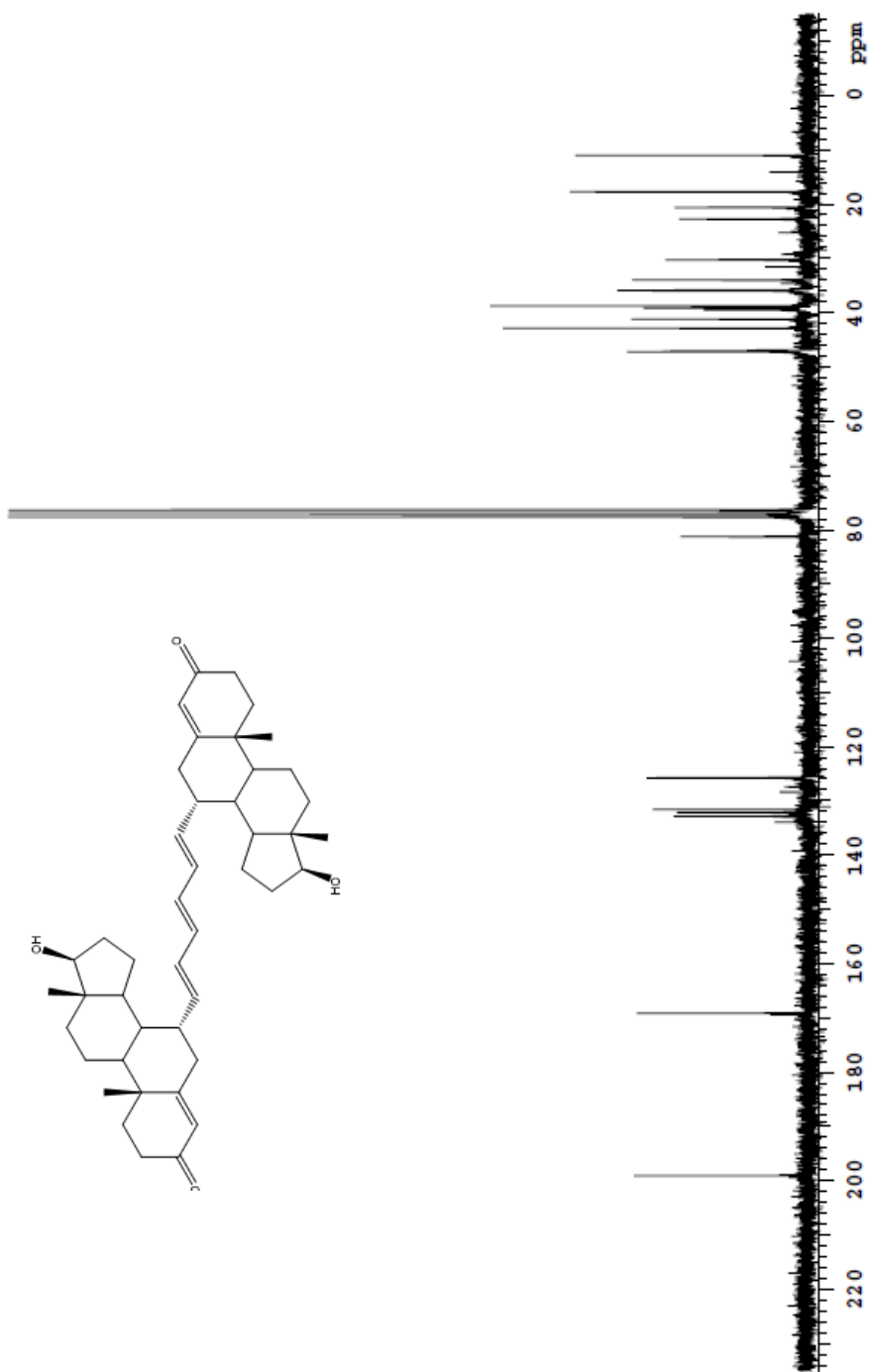
Spectre B1.5 RMN  $^1\text{H}$  du 7 $\alpha$ -(buta-1,3-dienyl)-4-androsten-3,17-dione (**13**)

Spectre B1.6 RMN  $^{13}\text{C}$  du  $7\alpha$ -(buta-1,3-dienyl)-4-androsten-3,17-dione (13)

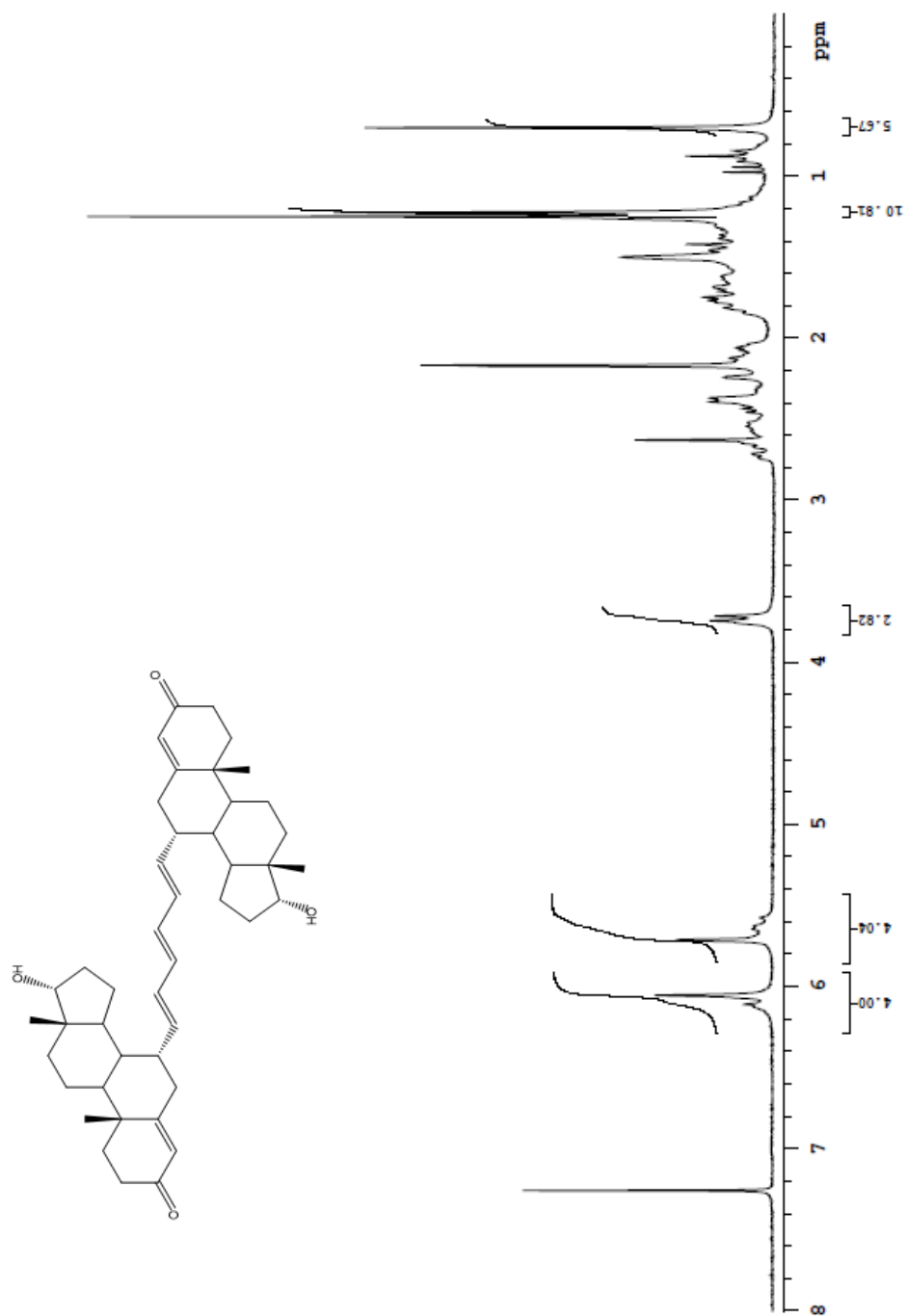
Spectre B1.7 RMN  $^1\text{H}$  du *trans,trans,trans*-1,6-bis-(17 $\beta$ -hydroxy-4-androsten-3-one-7 $\alpha$ -yl)hexatriene (**14 $\beta$** )



Spectre B1.8 RMN  $^{13}\text{C}$  du *trans,trans,trans*-1,6-bis-(17 $\beta$ -hydroxy-4-androsten-3-one-7 $\alpha$ -yl)hexatriene (**14 $\beta$** )

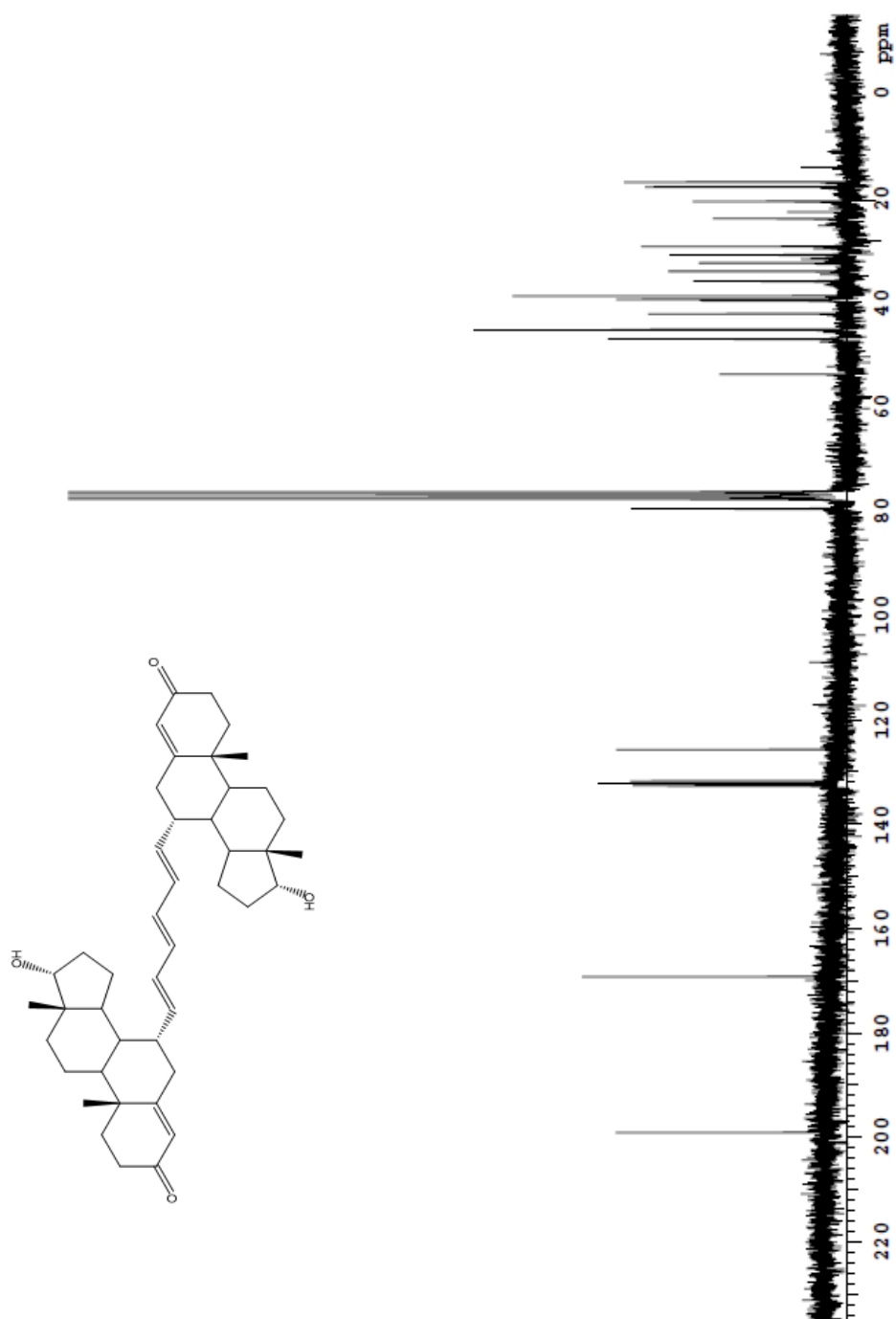


Spectre B1.9 RMN  $^1\text{H}$  du *trans,trans,trans*-1,6-bis-(17 $\alpha$ -hydroxy-4-androsten-3-one-7 $\alpha$ -yl)hexatriene (**14a**)

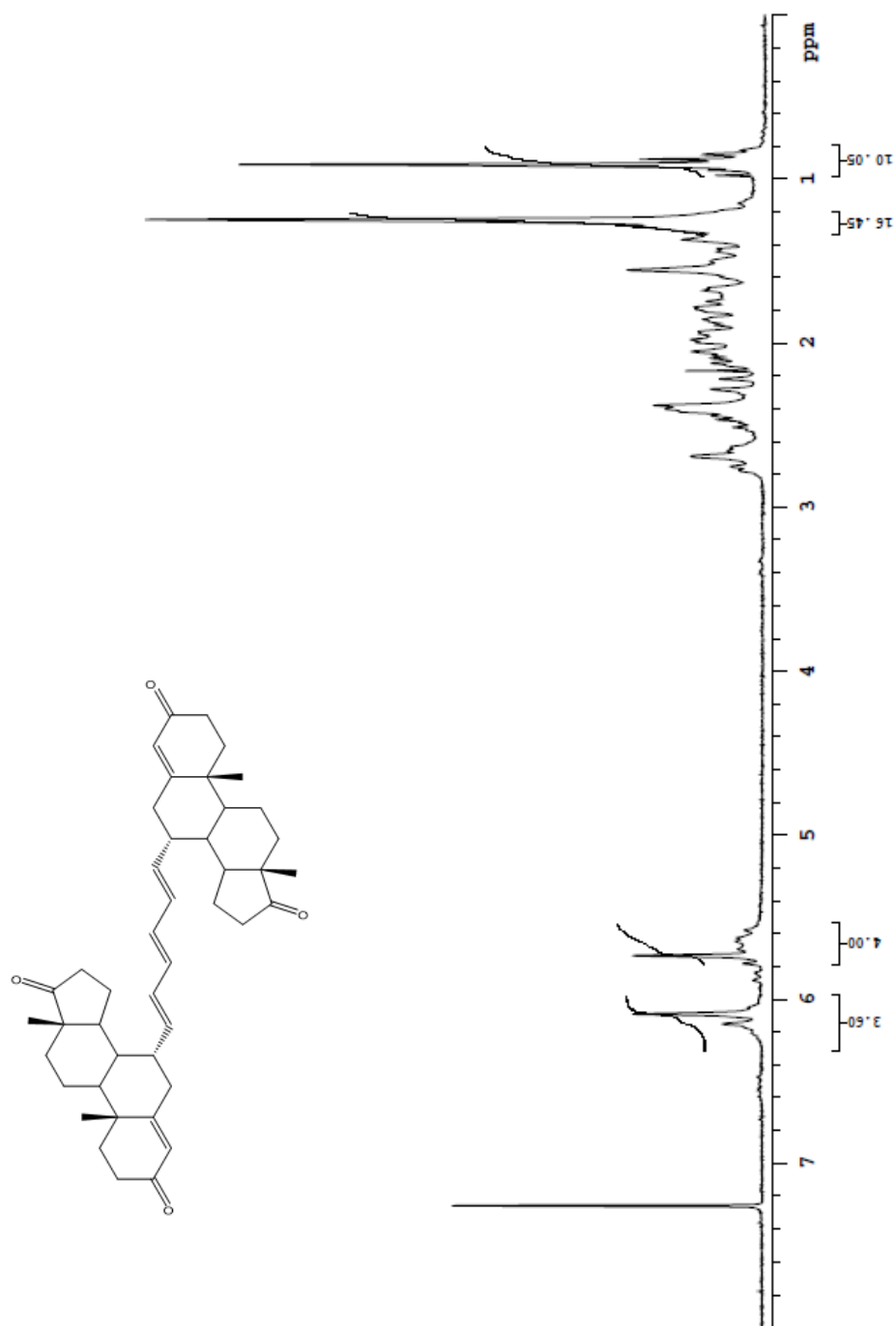




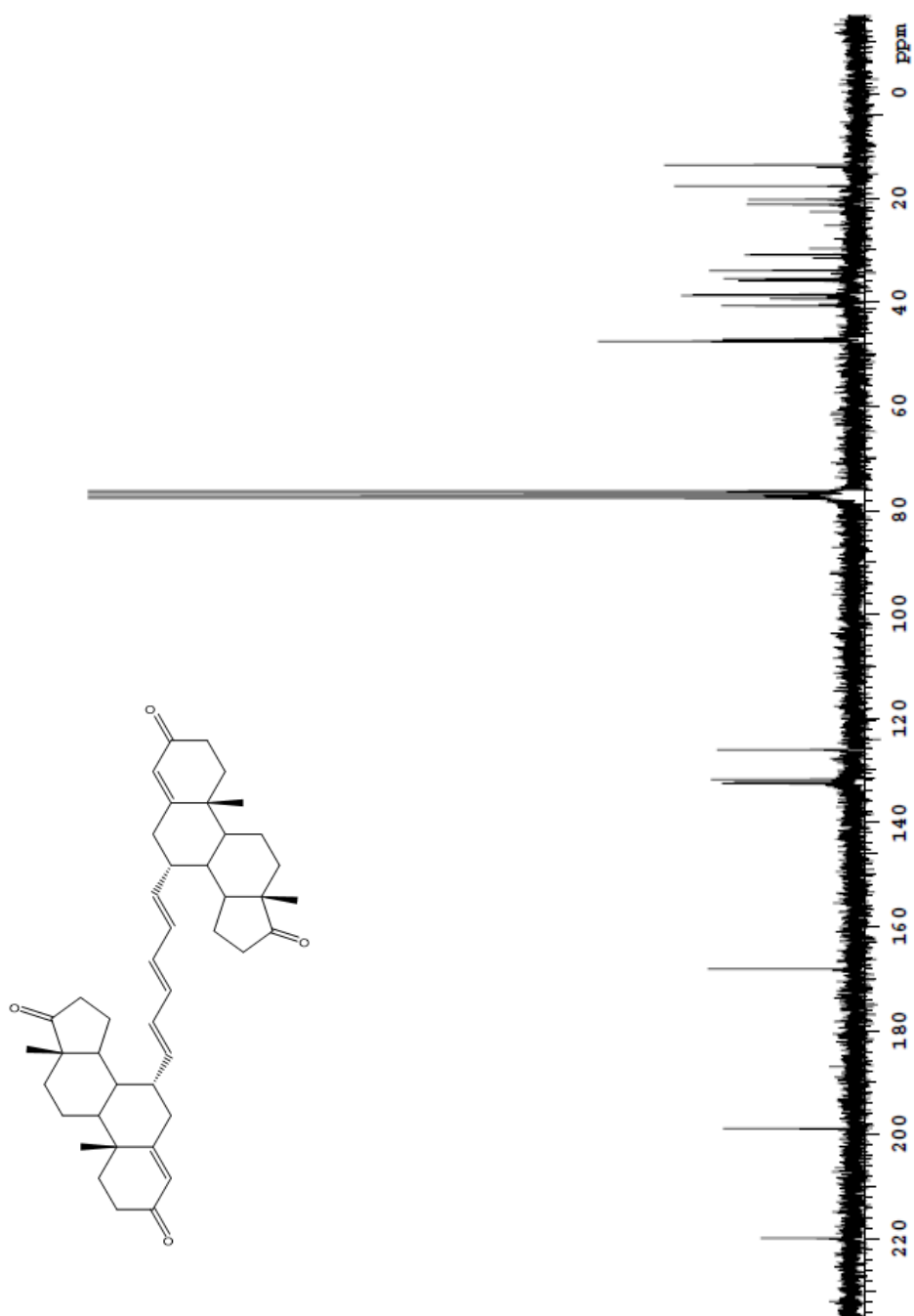
Spectre B1.10 RMN  $^{13}\text{C}$  du *trans,trans,trans*-1,6-bis-(17 $\alpha$ -hydroxy-4-androsten-3-one-7 $\alpha$ -yl)hexatriene (**14a**)



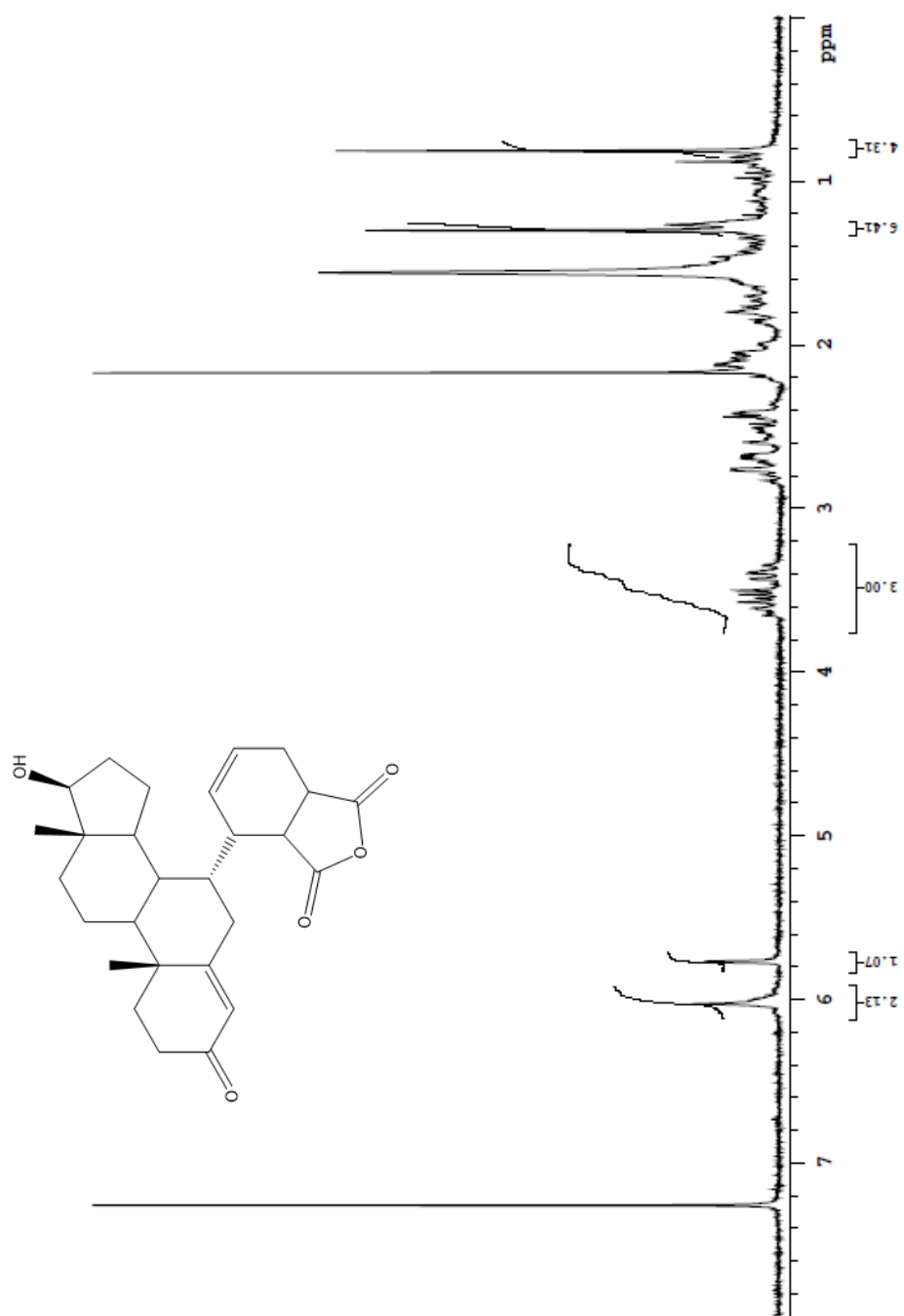
Spectre B1.11 RMN  $^1\text{H}$  du *trans,trans,trans*-1,6-bis-(4-androsten-3,17-dione-7 $\alpha$ -yl)hexatriene (14)



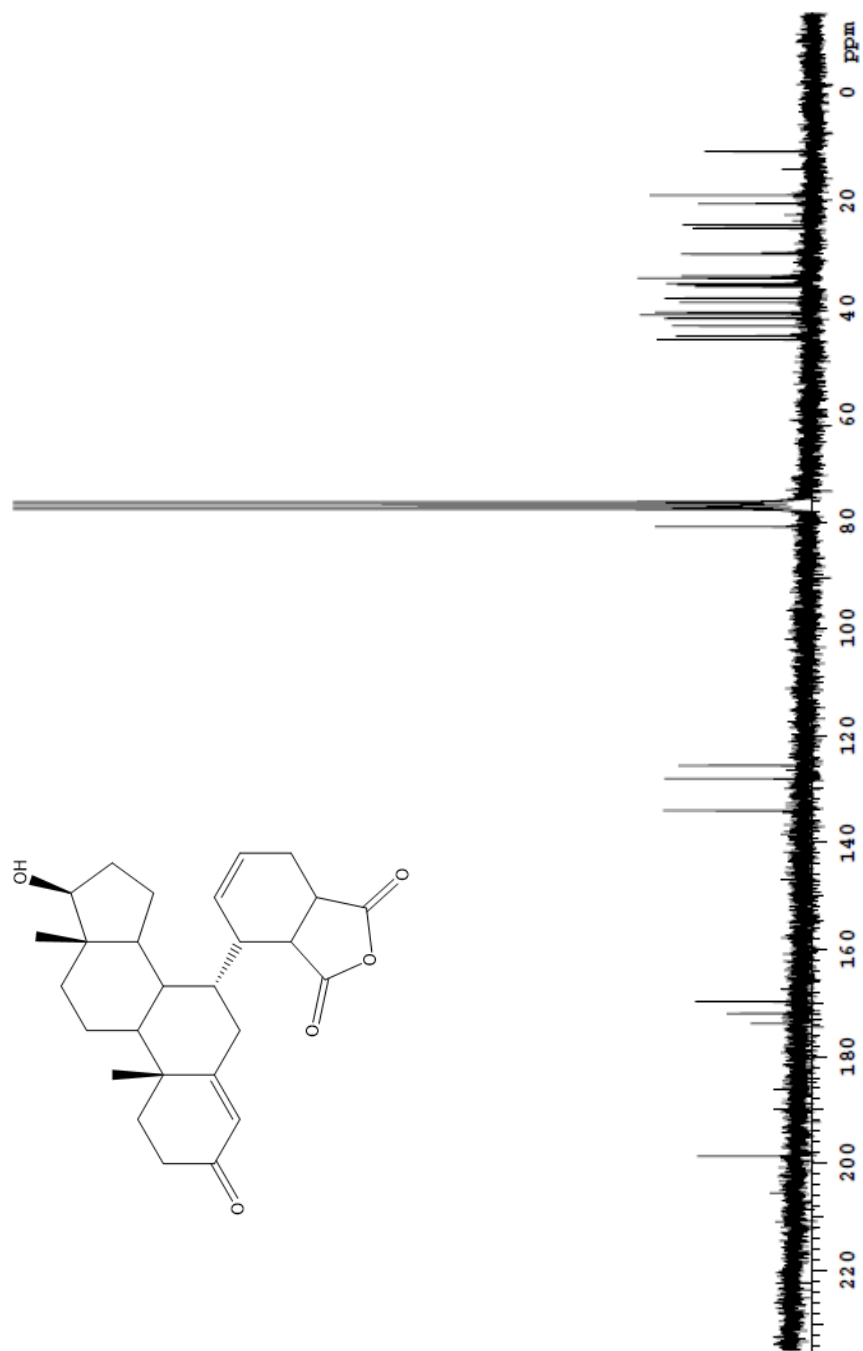
Spectre B1.12 RMN  $^{13}\text{C}$  du *trans,trans,trans*-1,6-bis-(4-androsten-3,17-dione-7 $\alpha$ -yl)hexatriene (14)



Spectre B1.13 RMN  $^1\text{H}$  du 4-(17 $\beta$ -hydroxy-4-androsten-3-one-7 $\alpha$ -yl)-3a,4,7,7a-tetrahydro-isobenzofuran-1,3-dione (**15**)



Spectre B1.14 RMN  $^{13}\text{C}$  du 4-(17 $\beta$ -hydroxy-4-androsten-3-one-7 $\alpha$ -yl)-3a,4,7,7a-tetrahydro-isobenzofuran-1,3-dione (**15**)

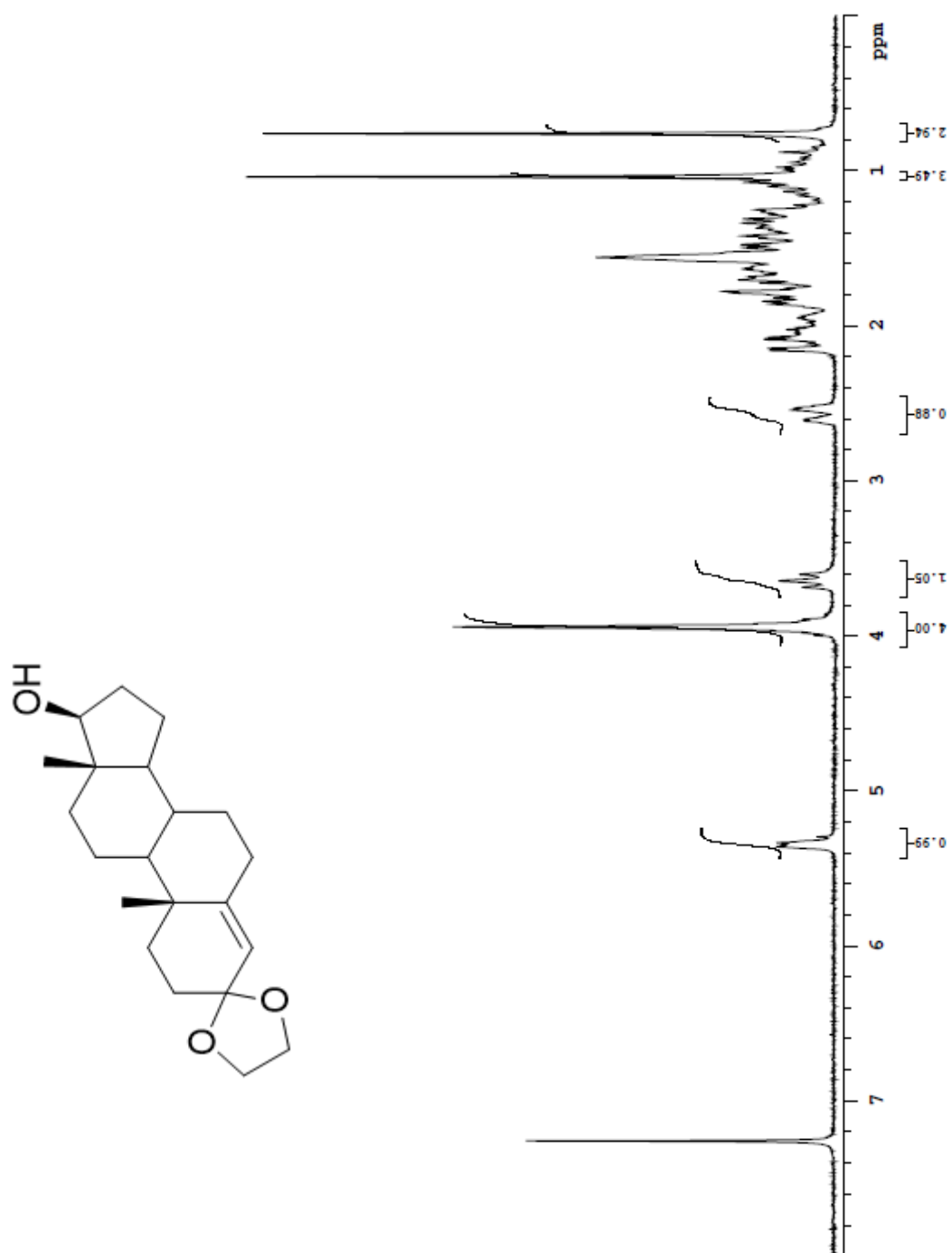


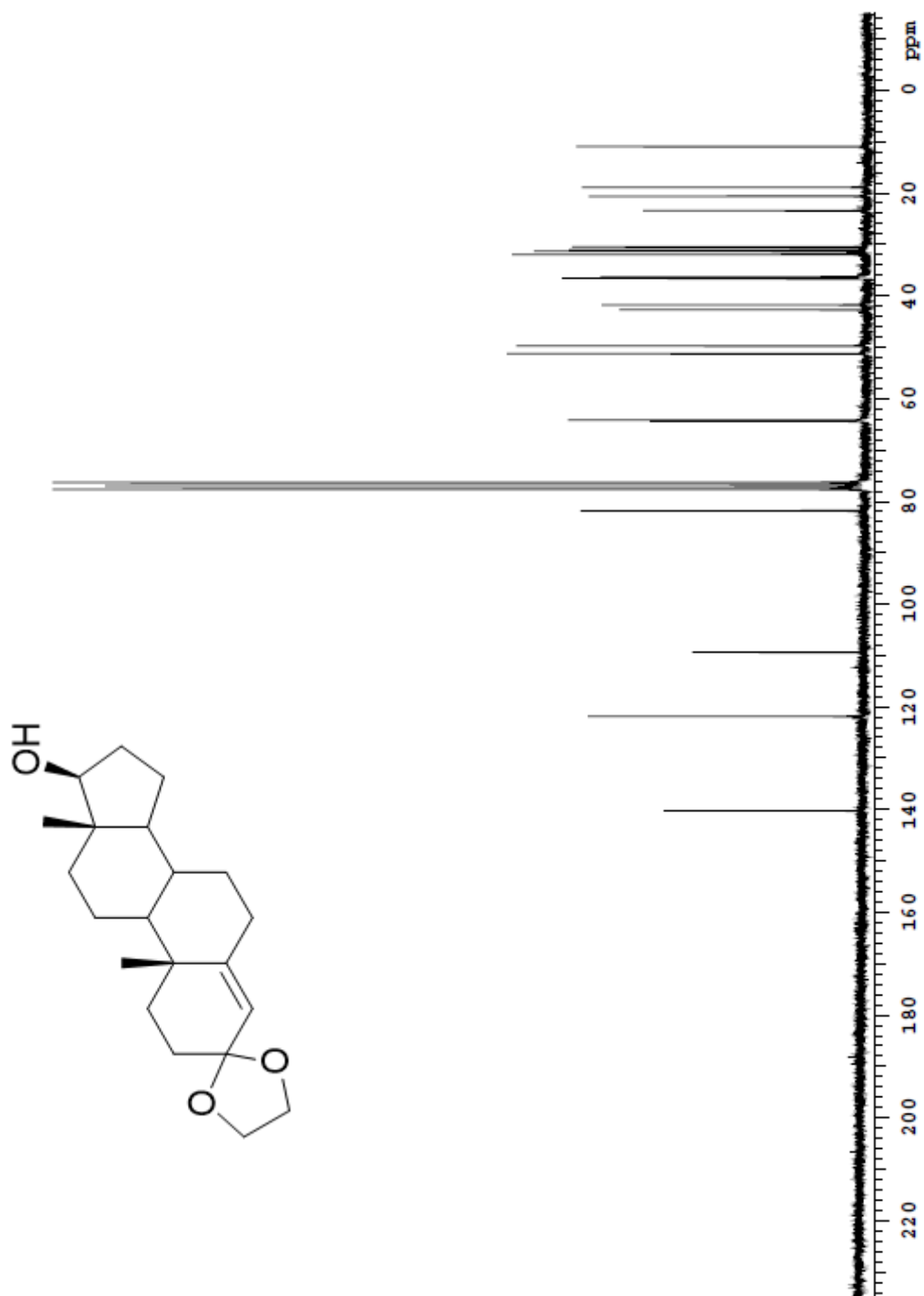
## ANNEXE B2

### SPECTRES RMN $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$ DES COMPOSÉS DU CHAPITRE V

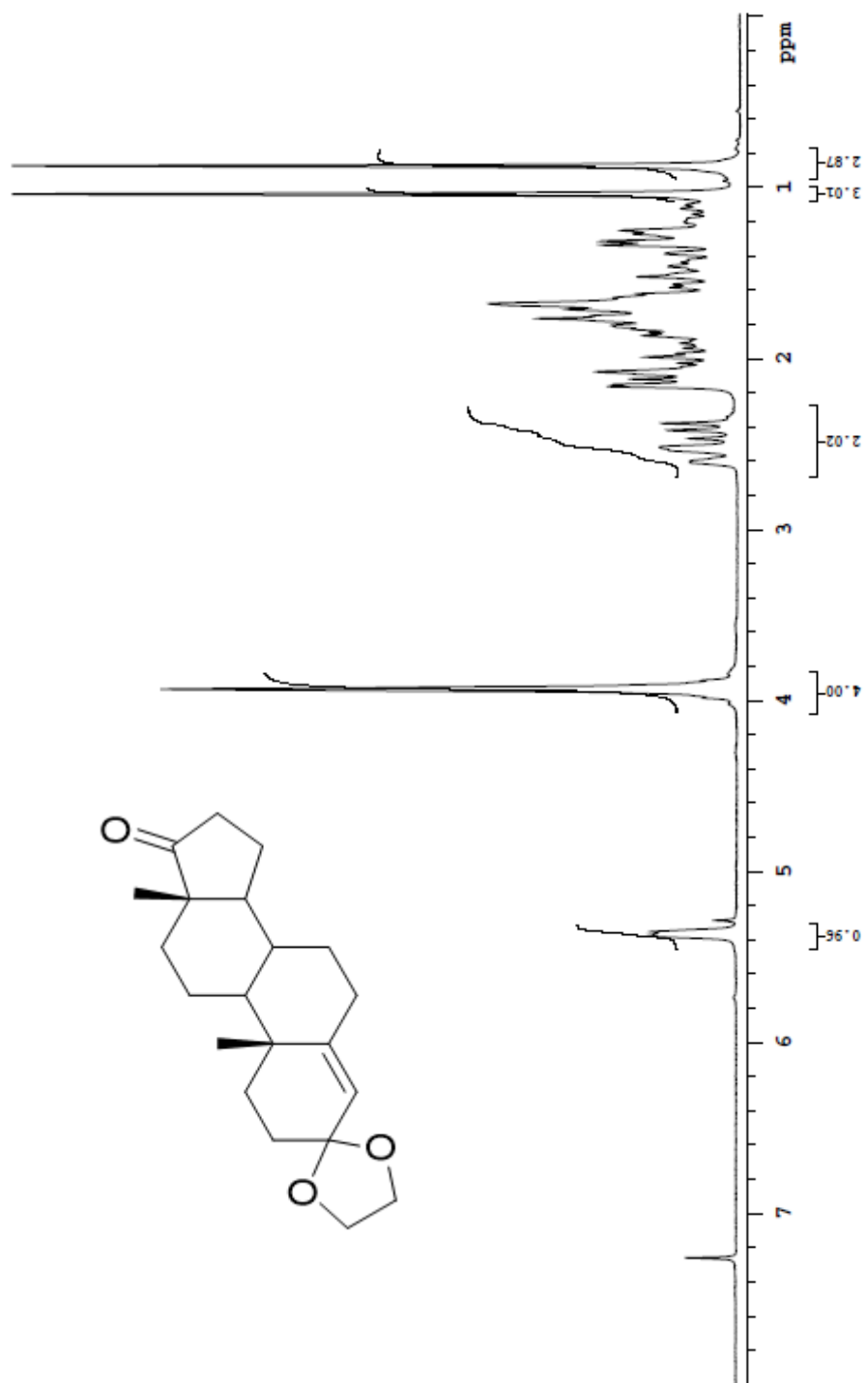
Les spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  sont présentés selon la numérotation respective des molécules contenues dans le corps du texte.

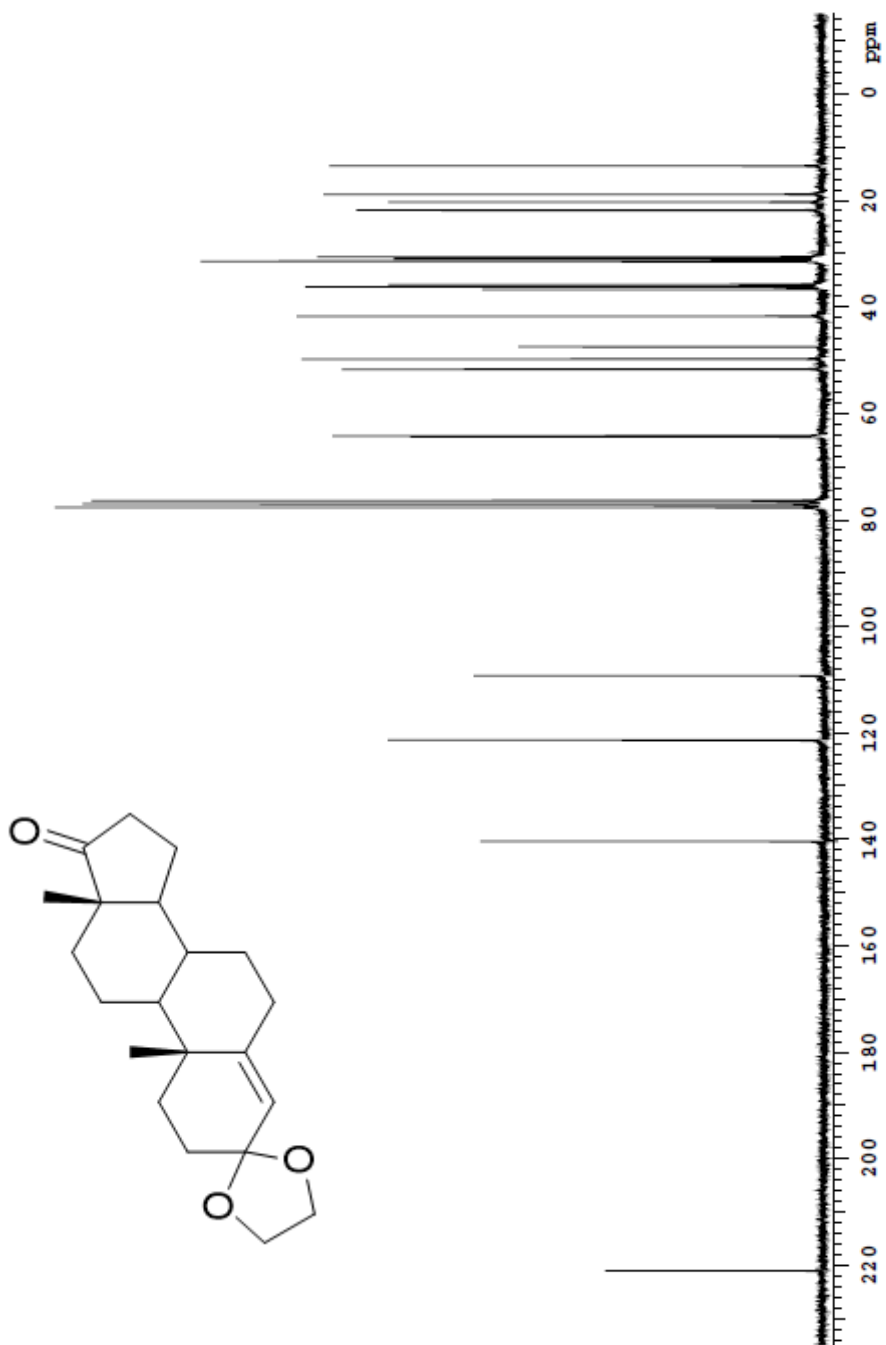
NB. – Les spectres des dimères **4<sub>2-6</sub>** contiennent des mélanges avec des analogues possédant des longueurs de chaînes différentes.

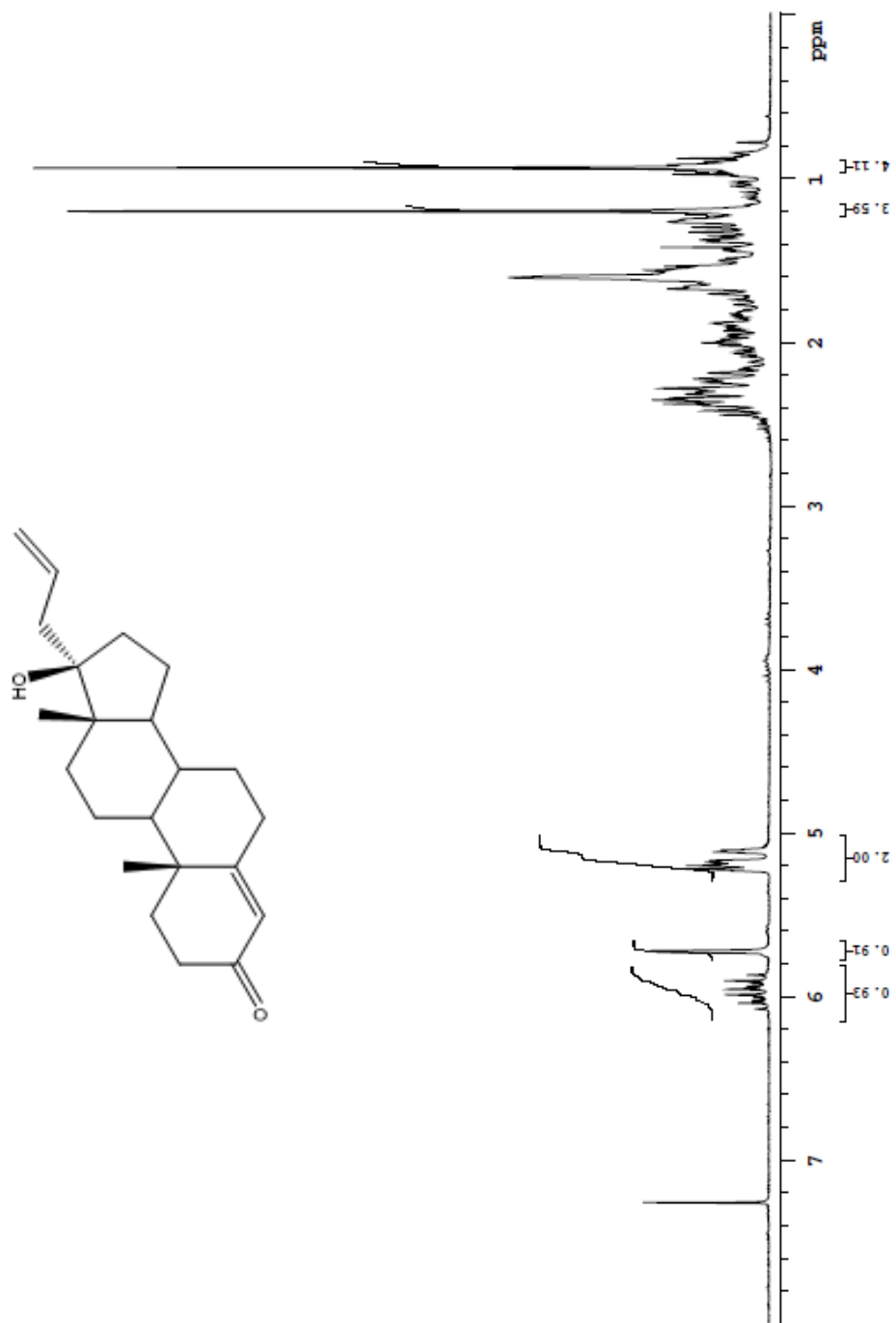
Spectre B2.1 RMN  $^1\text{H}$  de l'androst-4-èn-17 $\beta$ -ol spiro-(1,3)dioxolane (**1**)

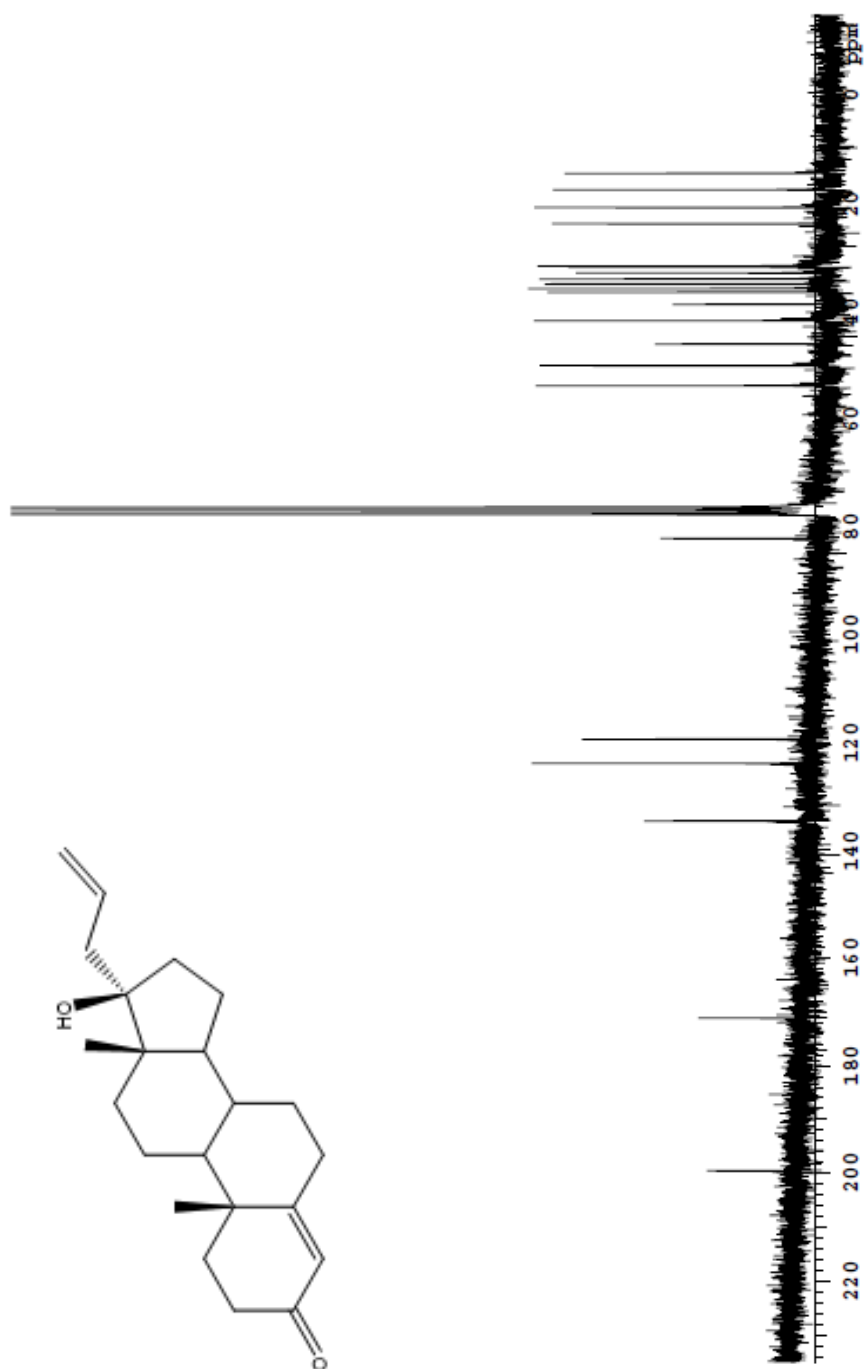
Spectre B2.2 RMN  $^{13}\text{C}$  de l'androst-4-èn-17 $\beta$ -ol spiro-(1,3)dioxolane (1)

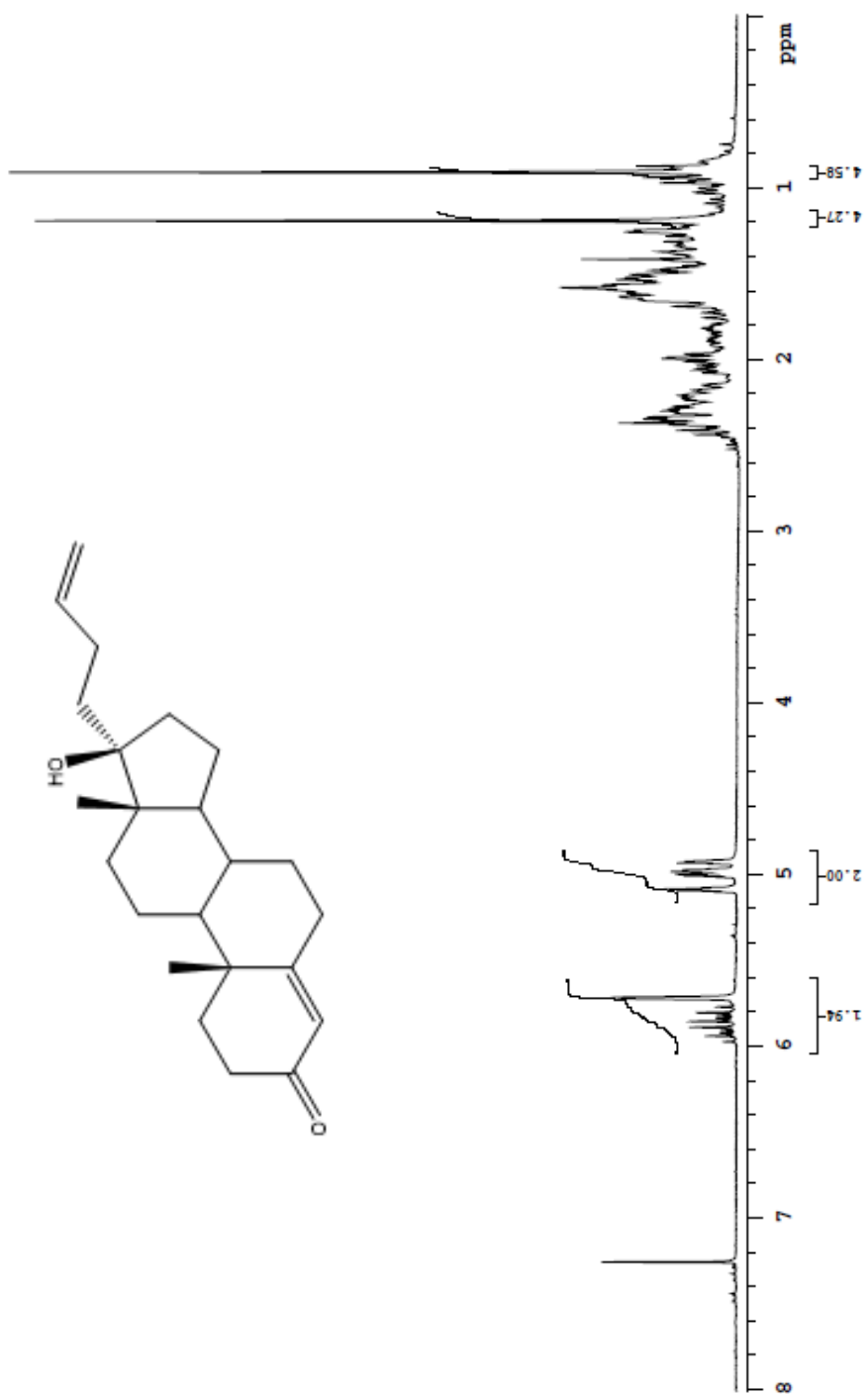


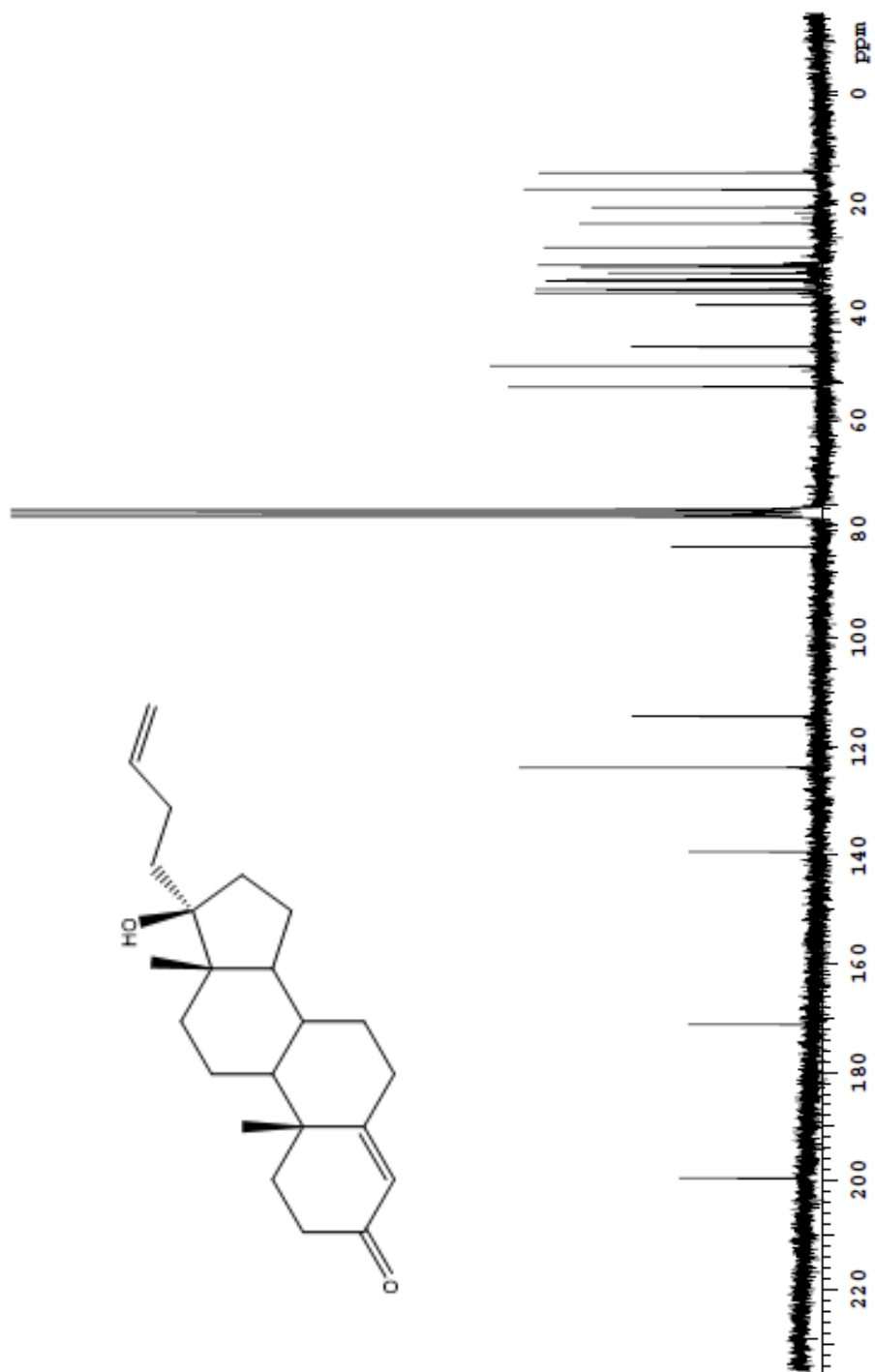
Spectre B2.3 RMN  $^1\text{H}$  de l'androst-4-èn-17-one spiro-(1,3)dioxolane (2)

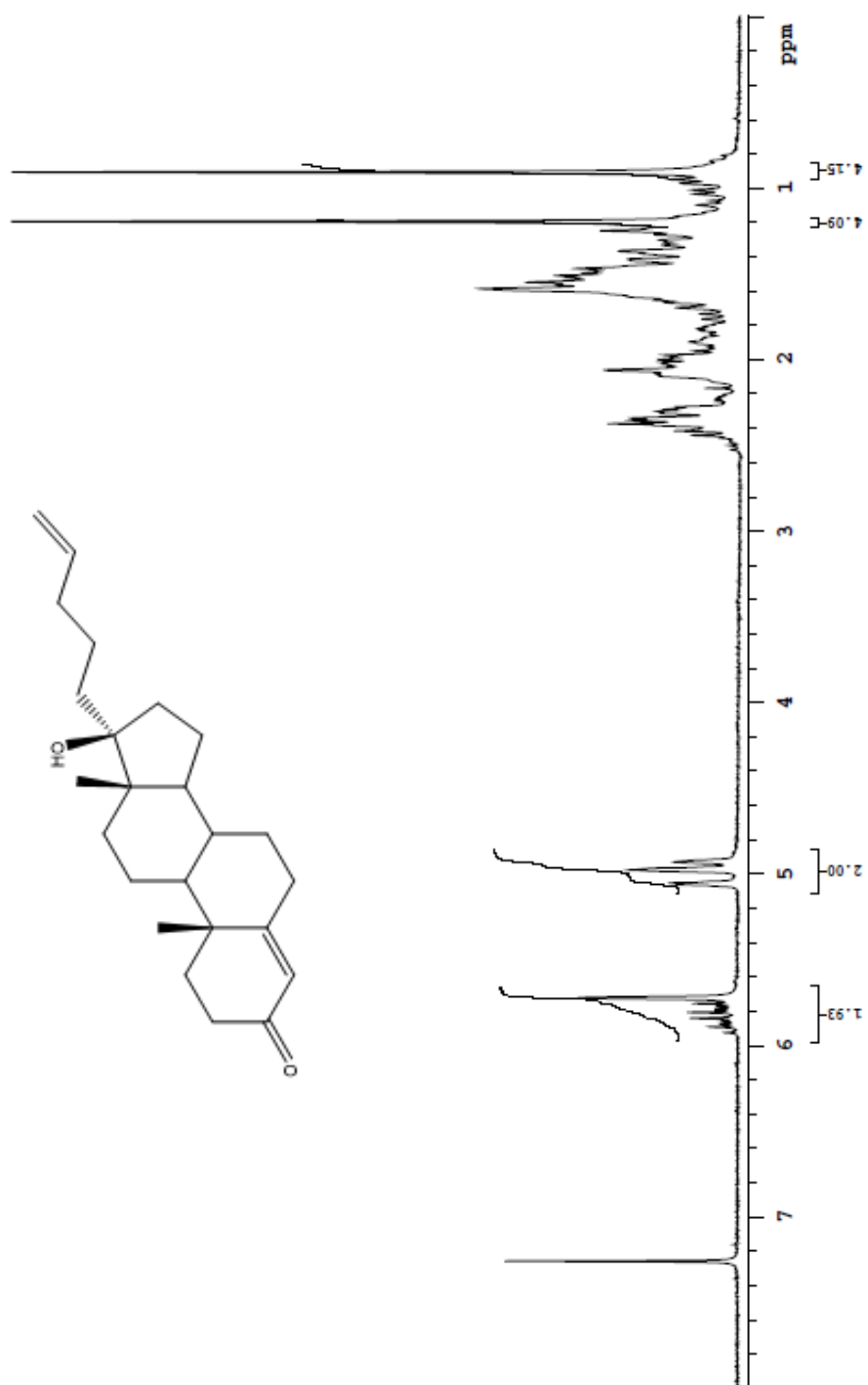
Spectre B2.4 RMN  $^{13}\text{C}$  de l'androst-4-èn-17-one spiro-(1,3)dioxolane (2)

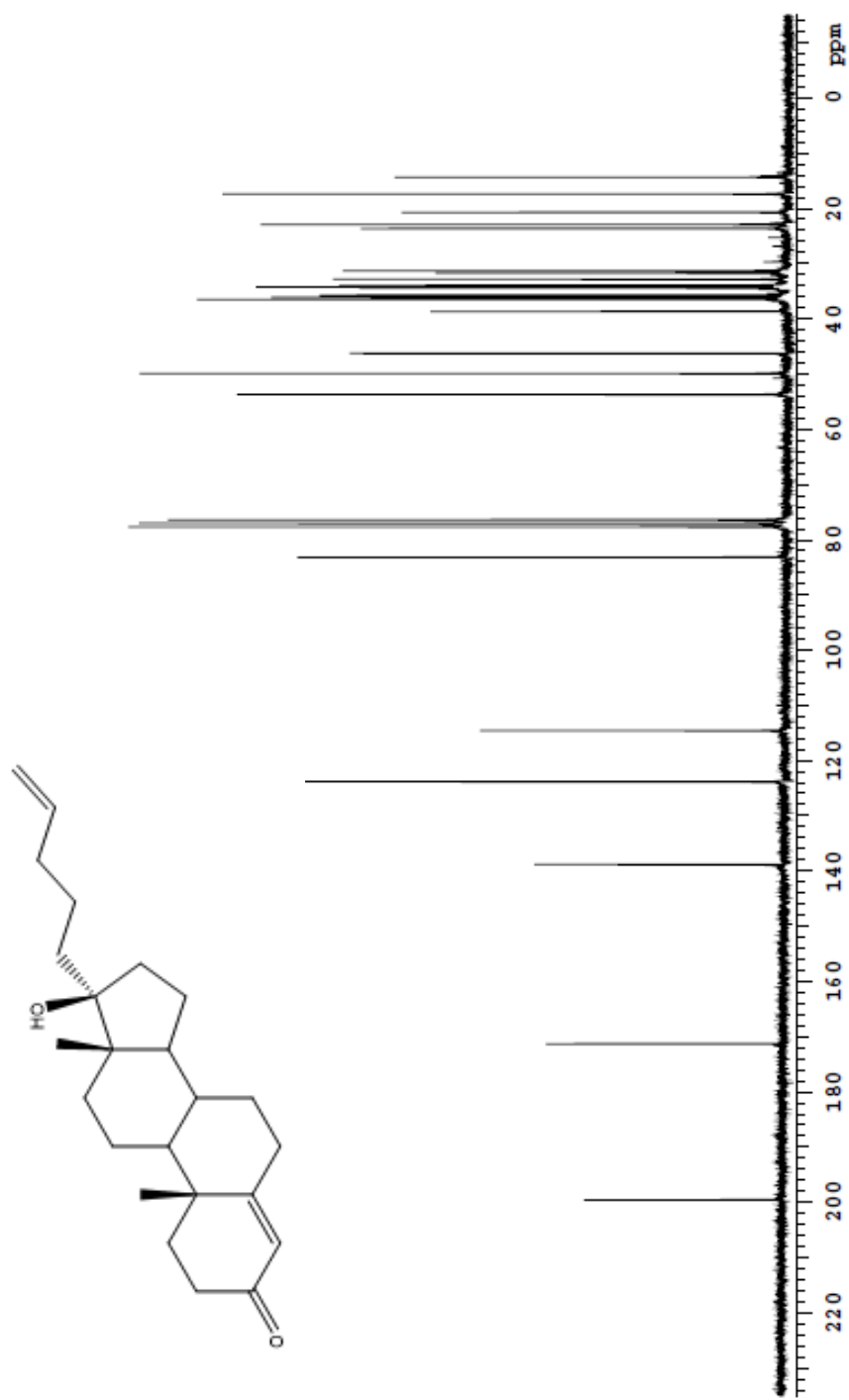
Spectre B2.5 RMN  $^1\text{H}$  du  $17\alpha$ -allyl-androst-4-èn-3-one- $17\beta$ -ol (**31**)

Spectre B2.6 RMN  $^{13}\text{C}$  du  $17\alpha$ -allyl-androst-4-èn-3-one- $17\beta$ -ol (**31**)

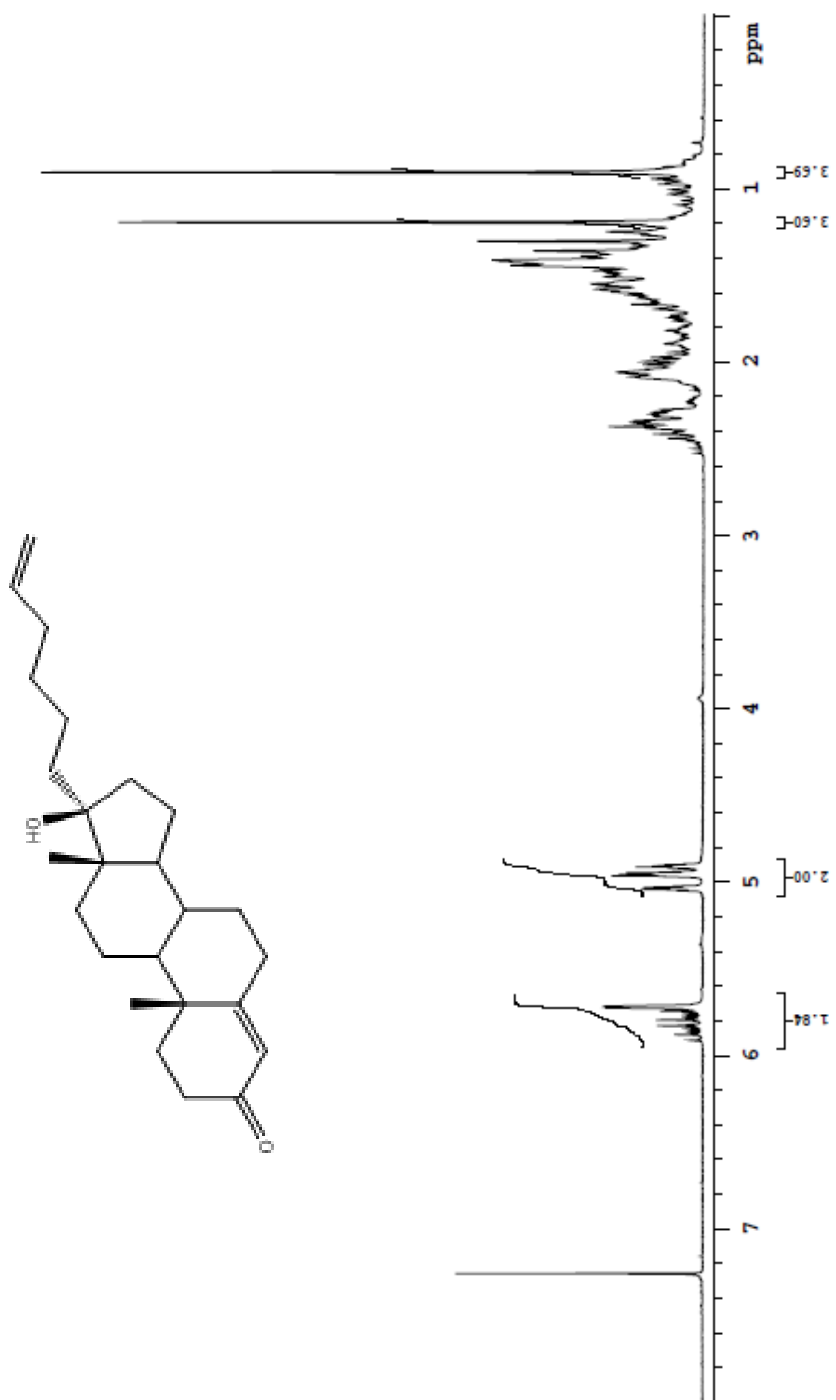
Spectre B2.7 RMN  $^1\text{H}$  du 17 $\alpha$ -(but-3- $\text{\acute{e}n-1-yl}$ )-androst-4- $\text{\acute{e}n-3-one-17}\beta$ -ol (**3**<sub>2</sub>)

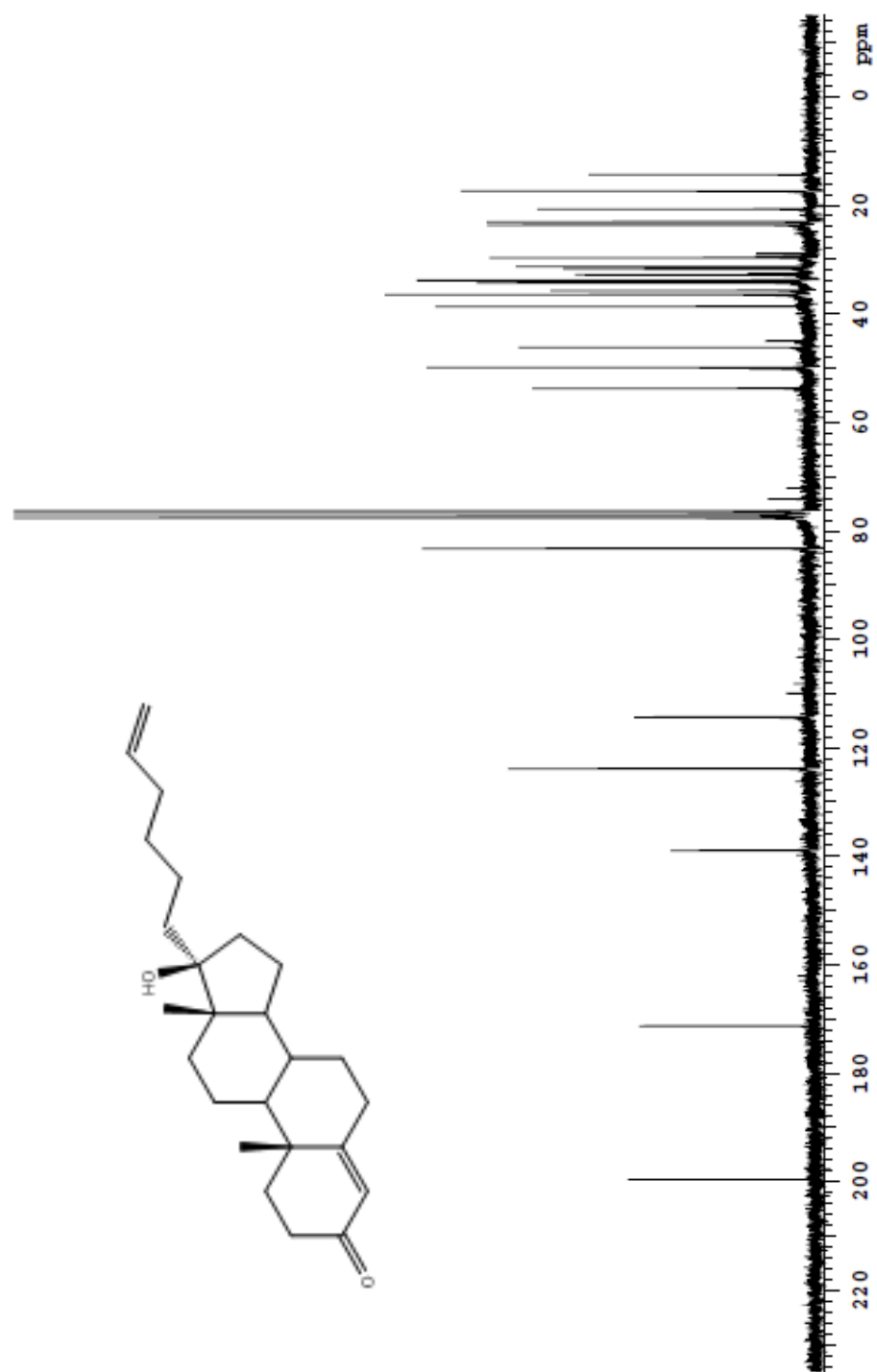
Spectre B2.8 RMN  $^{13}\text{C}$  du  $17\alpha$ -(but-3-èn-1-yl)-androst-4-èn-3-one- $17\beta$ -ol ( $3_2$ )

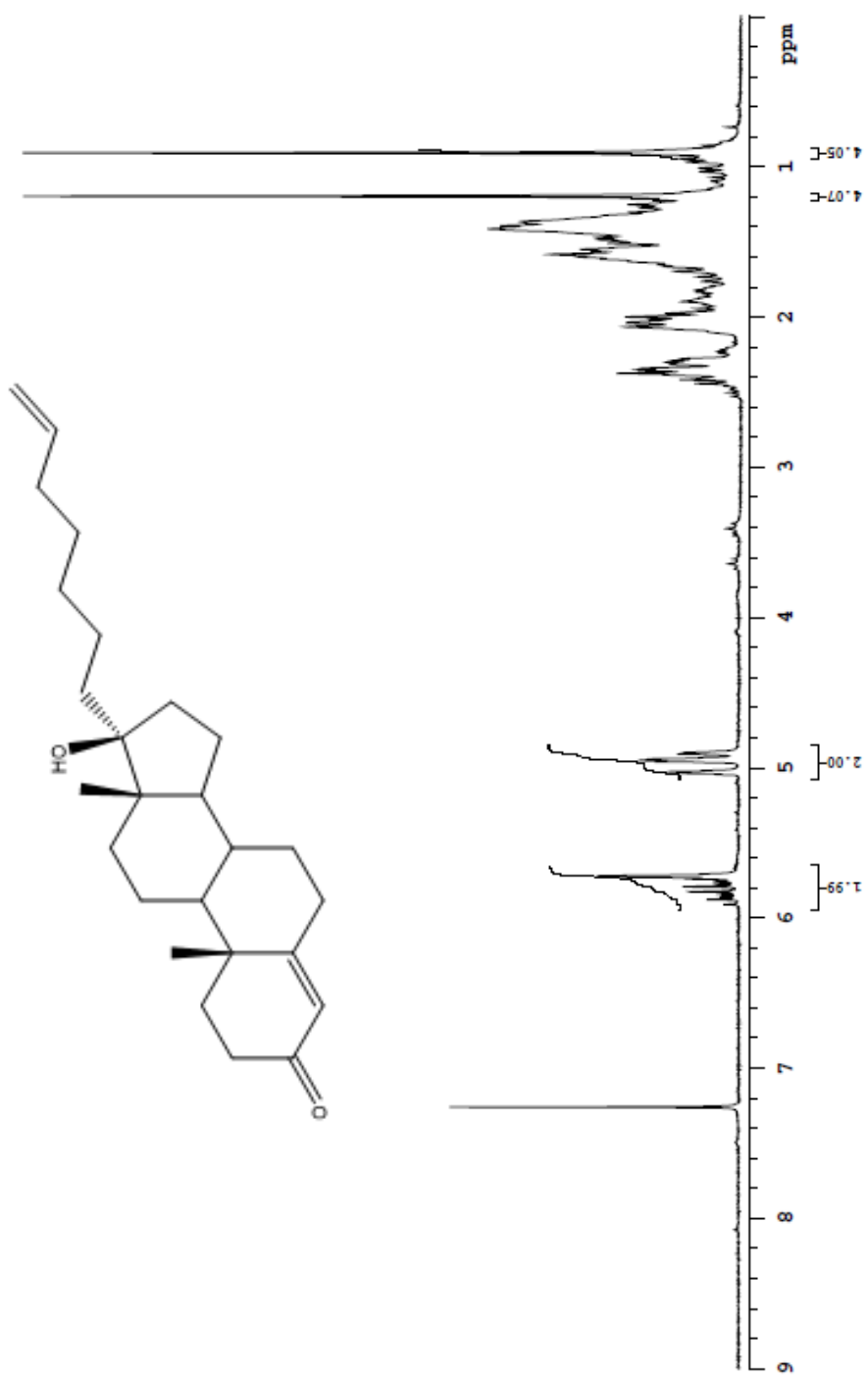
Spectre B2.9 RMN  $^1\text{H}$  du  $17\alpha$ -(pent-4-èn-1-yl)-androst-4-èn-3-one- $17\beta$ -ol (**3**)

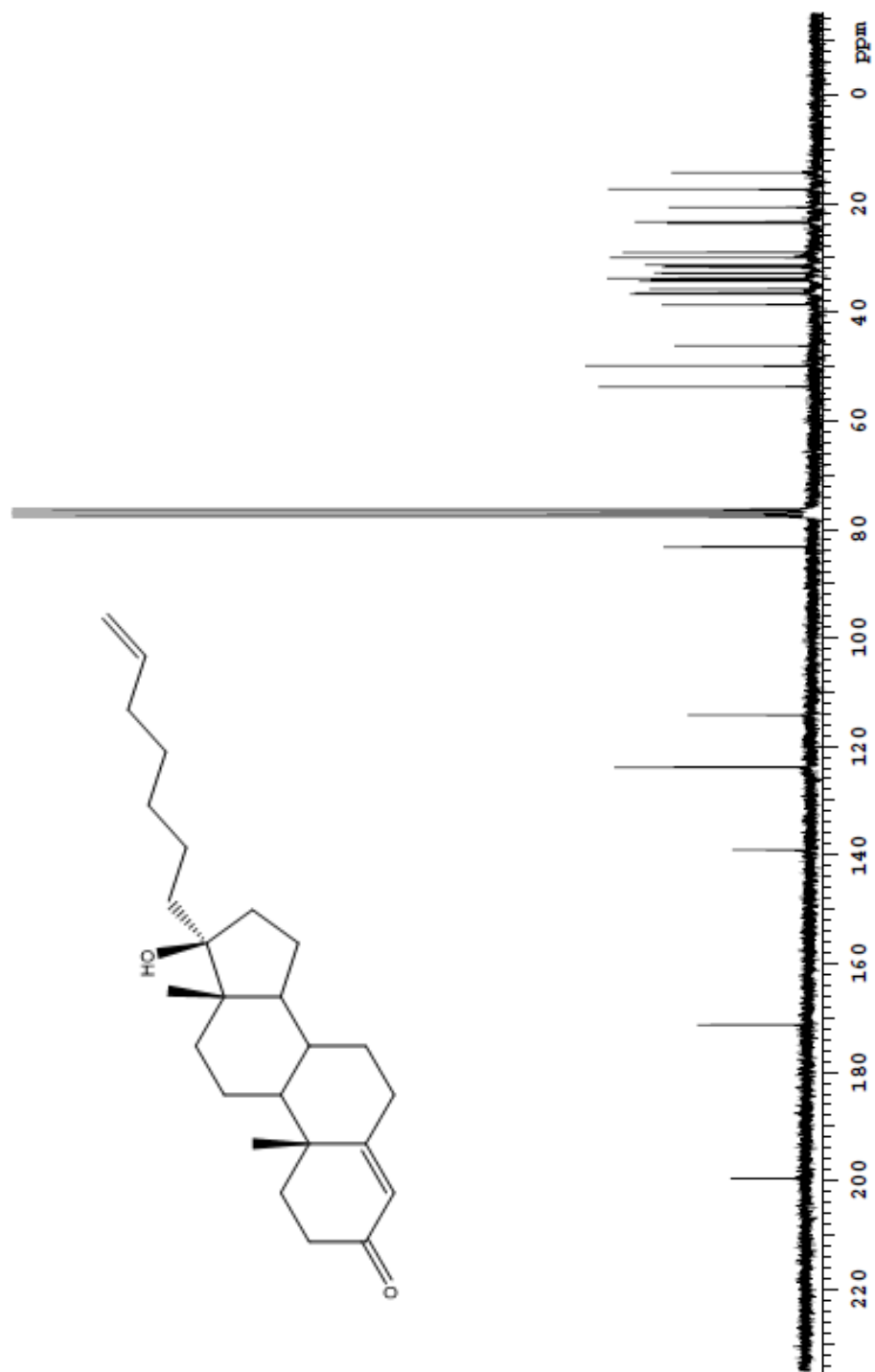
Spectre B2.10 RMN  $^{13}\text{C}$  du  $17\alpha$ -(pent-4-èn-1-yl)-androst-4-èn-3-one- $17\beta$ -ol (**33**)

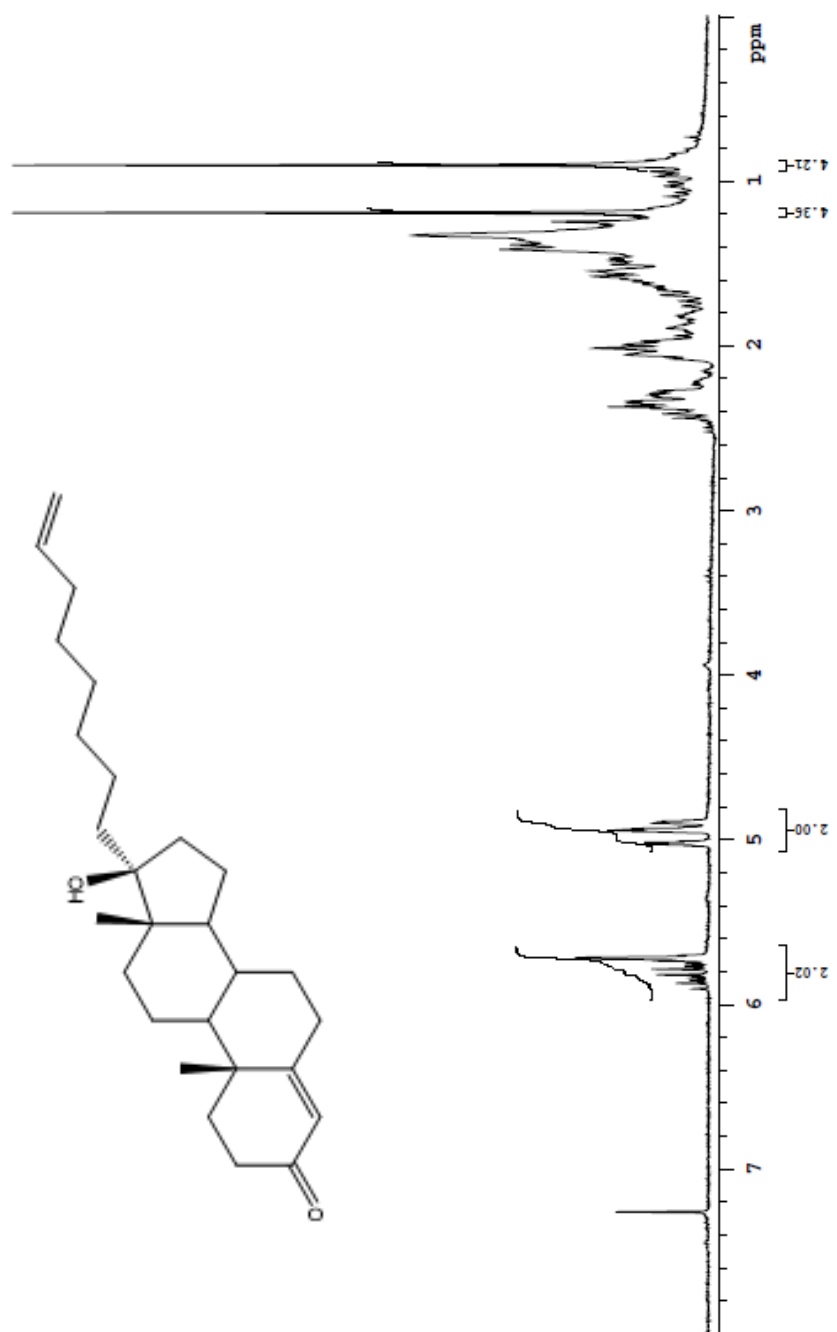


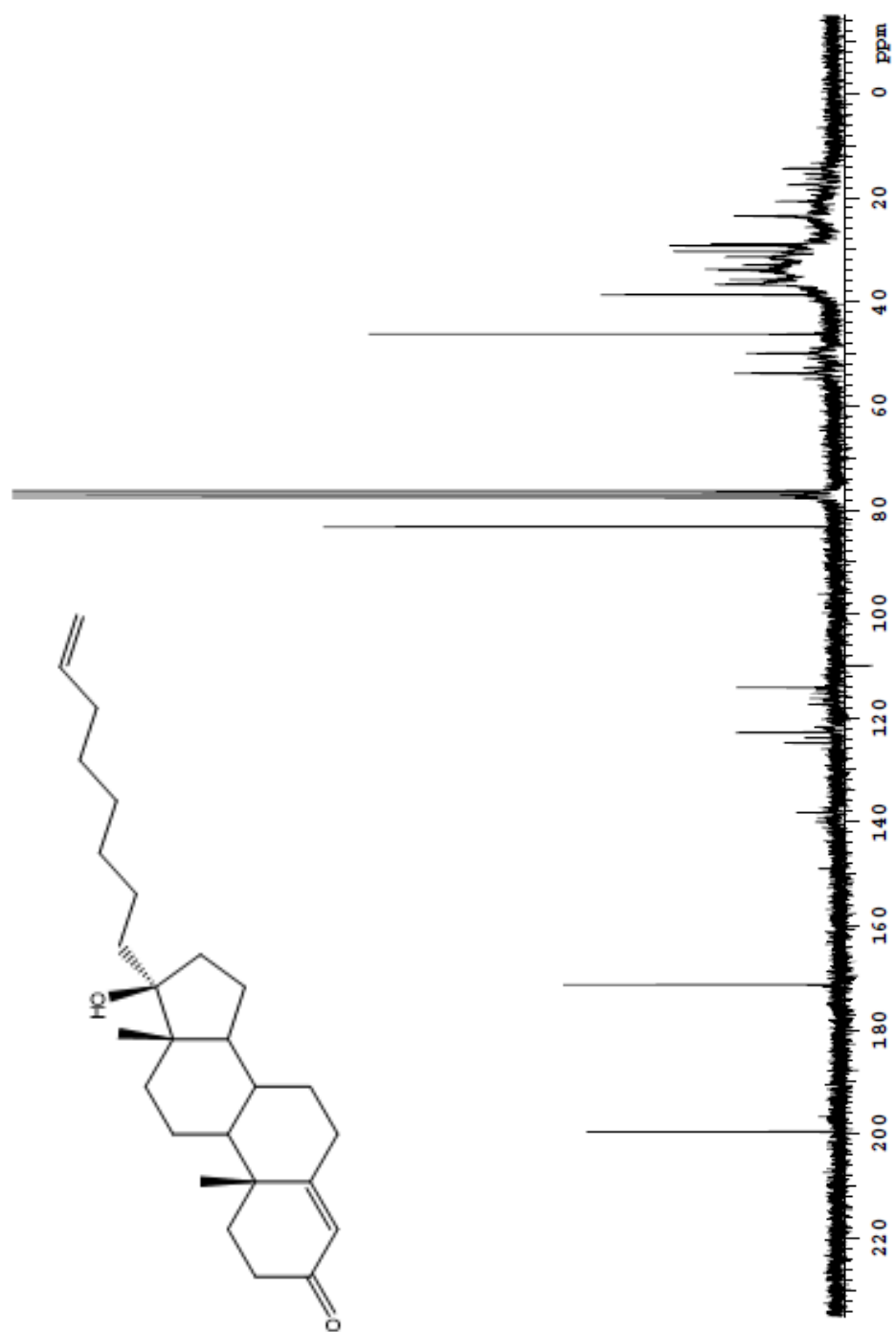
Spectre B2.11 RMN  $^1\text{H}$  du  $17\alpha$ -(hex-5-èn-1-yl)-androst-4-èn-3-one- $17\beta$ -ol (**34**)

Spectre B2.12 RMN  $^{13}\text{C}$  du  $17\alpha$ -(hex-5-èn-1-yl)-androst-4-èn-3-one- $17\beta$ -ol (**34**)

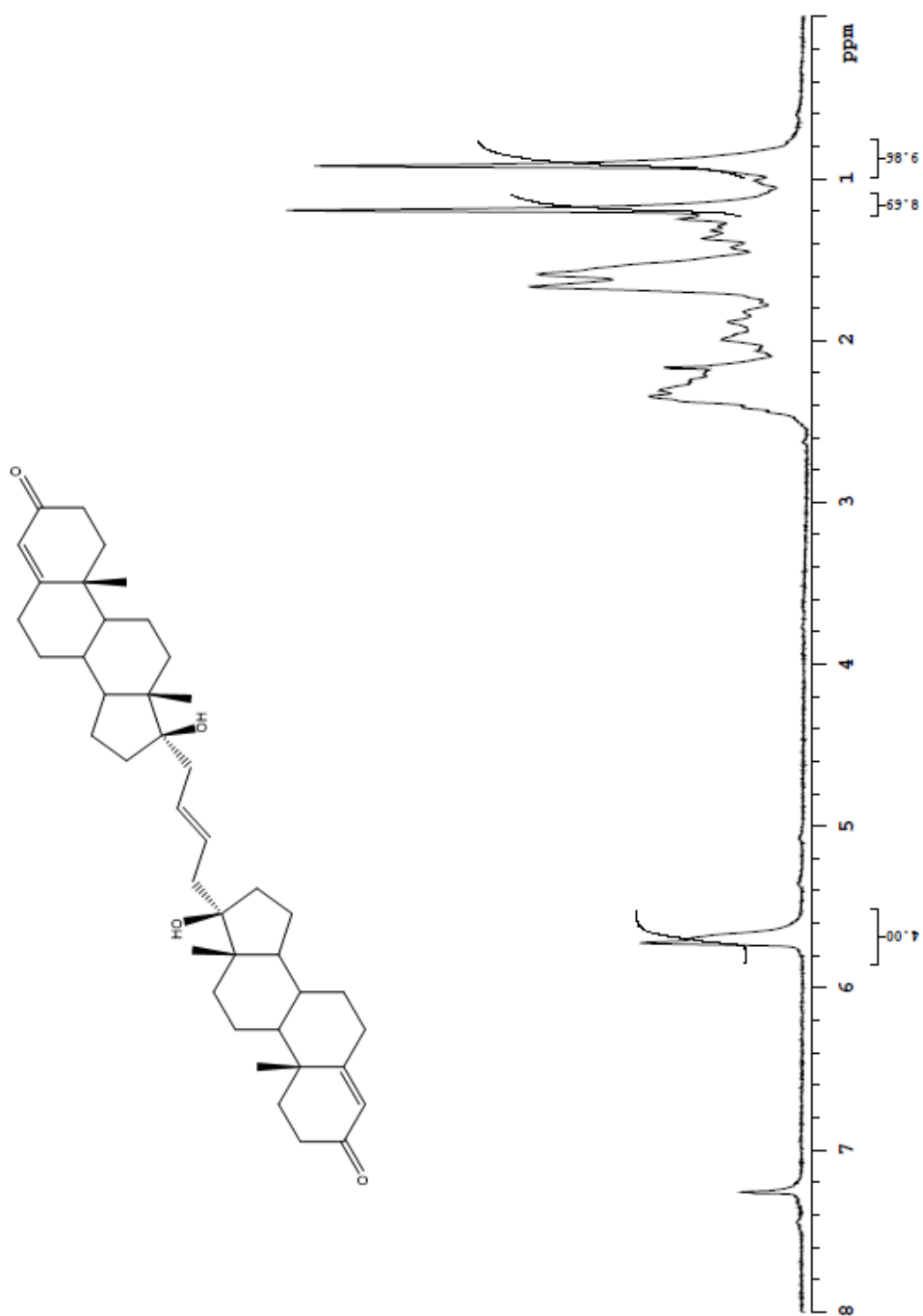
Spectre B2.13 RMN  $^1\text{H}$  du 17 $\alpha$ -(hept-6-èn-1-yl)-androst-4-èn-3-one-17 $\beta$ -ol (**35**)

Spectre B2.14 RMN  $^{13}\text{C}$  du  $17\alpha$ -(hept-6-èn-1-yl)-androst-4-èn-3-one- $17\beta$ -ol (**35**)

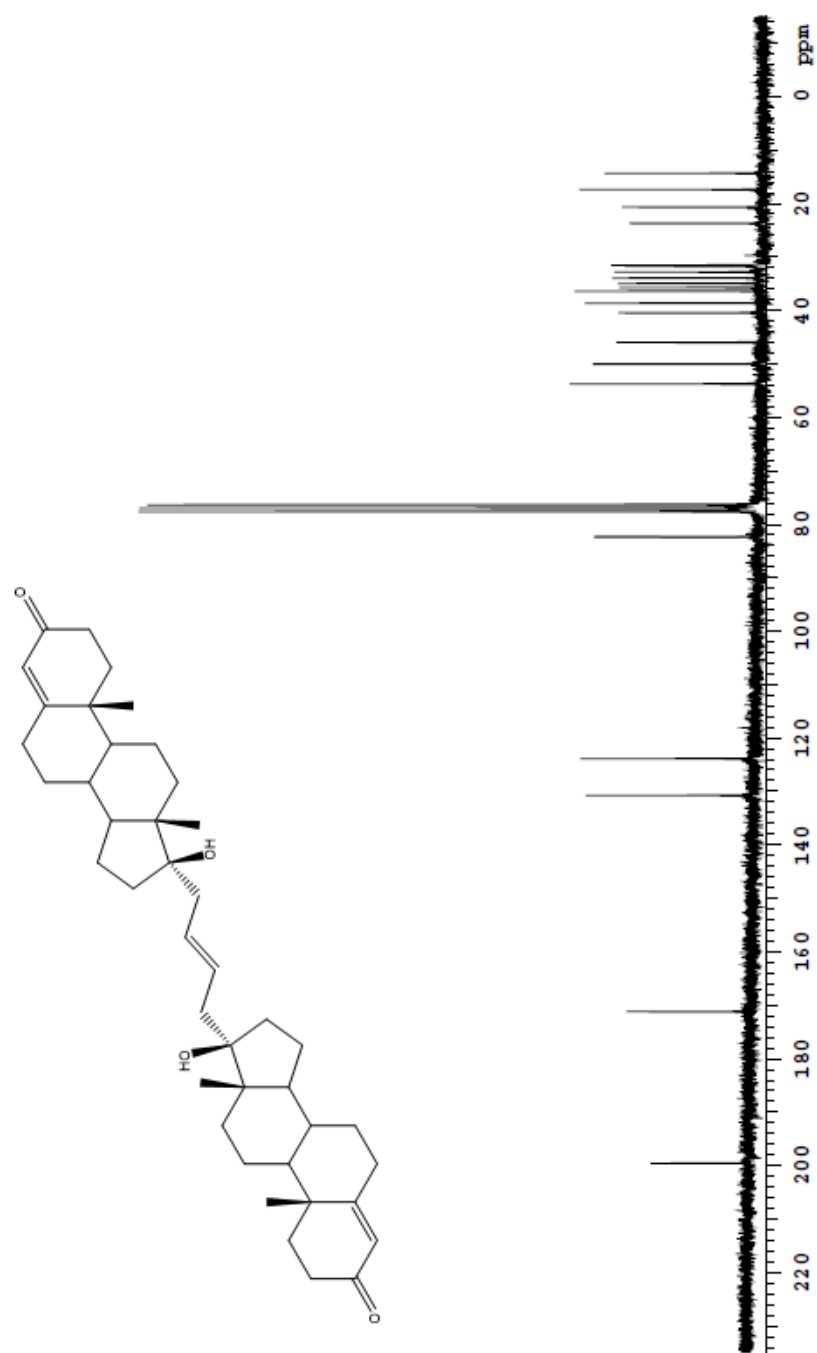
Spectre B2.15 RMN  $^1\text{H}$  du  $17\alpha$ -(oct-7-èn-1-yl)-androst-4-èn-3-one- $17\beta$ -ol (**36**)

Spectre B2.16 RMN  $^{13}\text{C}$  du  $17\alpha$ -(oct-7-èn-1-yl)-androst-4-èn-3-one- $17\beta$ -ol (**36**)

Spectre B2.17 RMN  $^1\text{H}$  du ((*E*)-17,17'-(but-2-ène-1,4-diyl))bis(androst-4-èn-3-one-17 $\beta$ -ol) (**4<sub>1</sub>**)

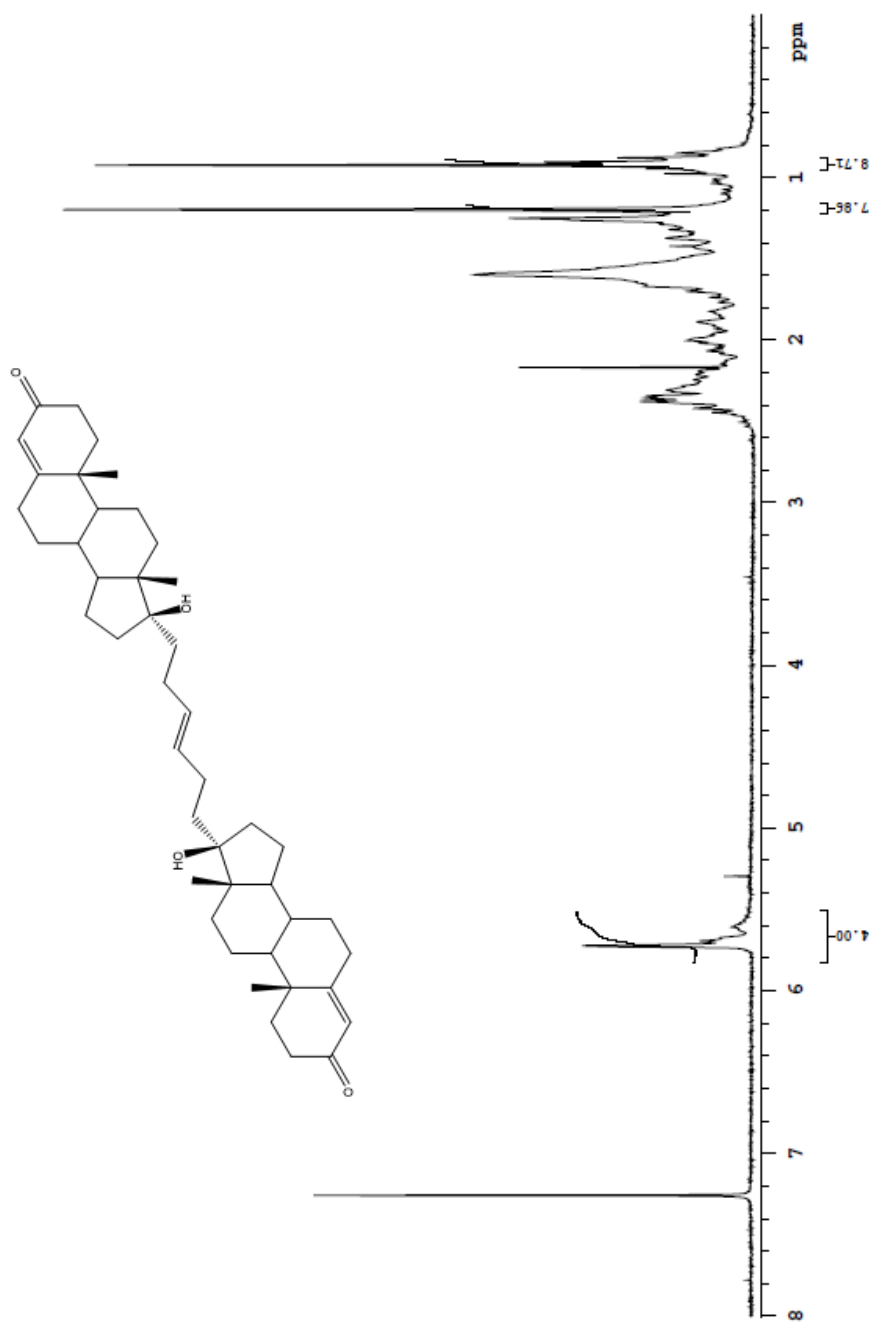


Spectre B2.18 RMN  $^{13}\text{C}$  du ((*E*)-17,17'-(but-2-ène-1,4-diyl))bis(androst-4-èn-3-one-17 $\beta$ -ol) (**4<sub>1</sub>**)

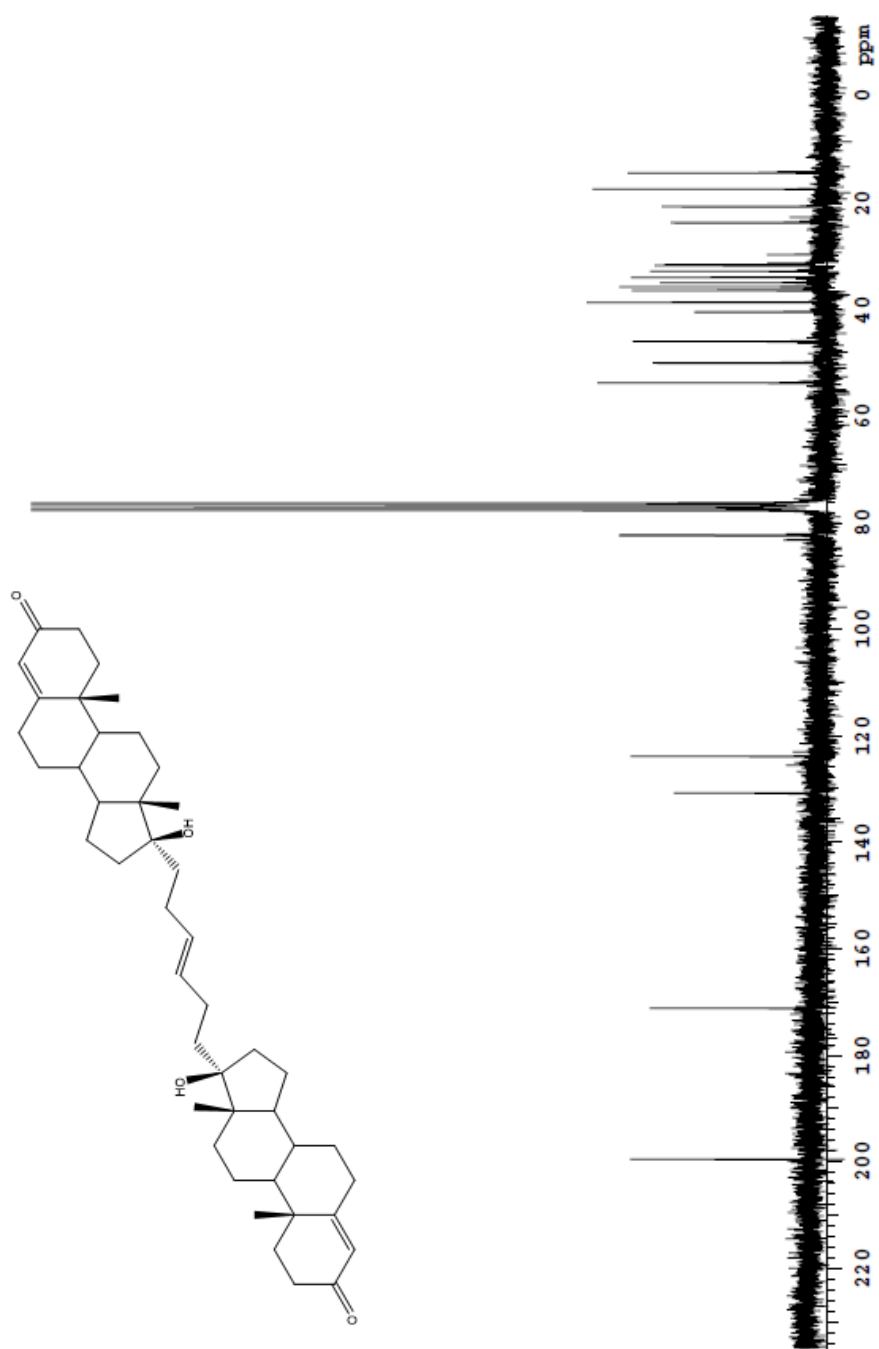




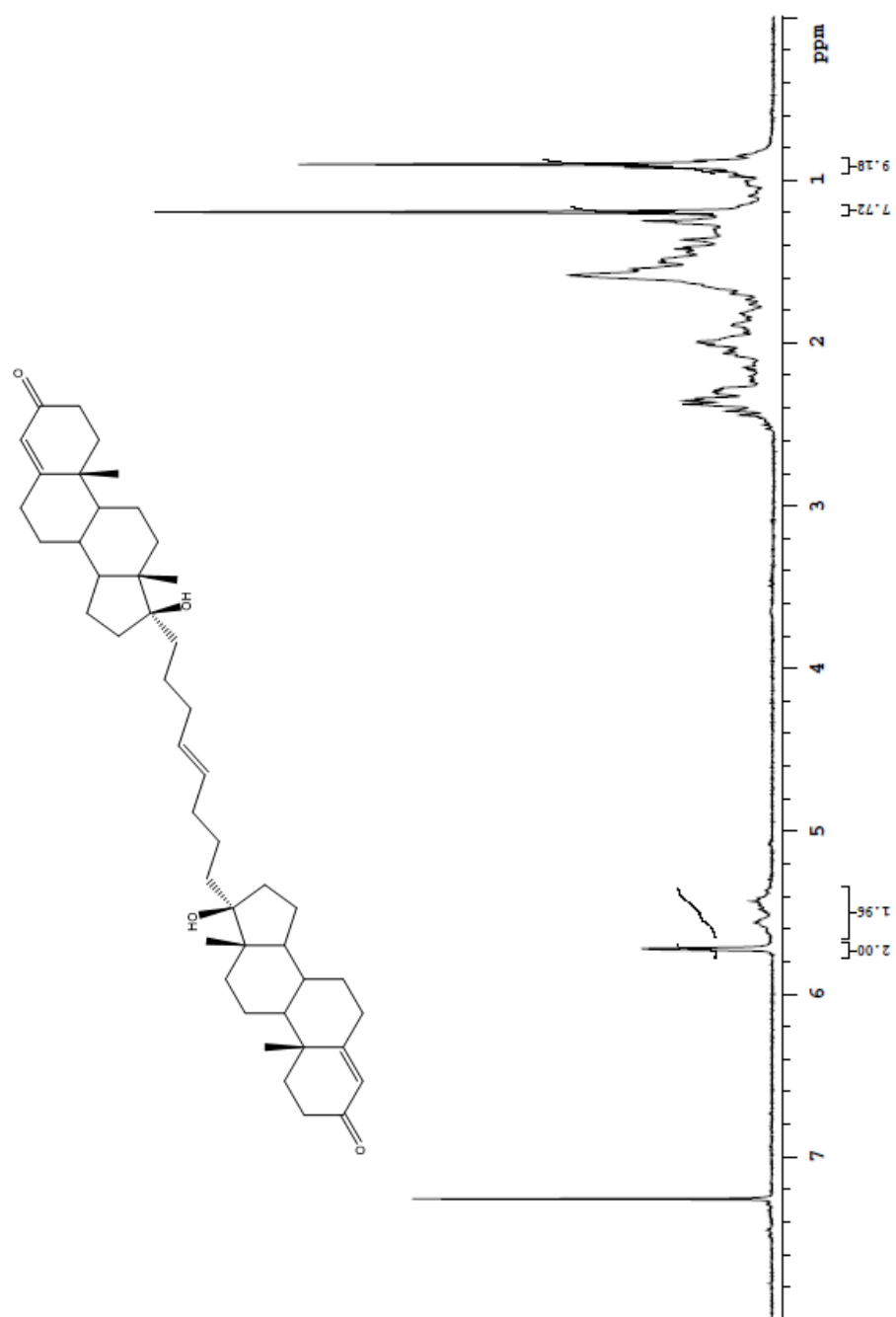
Spectre B2.19 RMN  $^1\text{H}$  du ((*E*)-17,17'-(hex-3-ène-1,6-diyl))bis(androst-4-èn-3-one-17 $\beta$ -ol) (**4**<sub>2</sub>)



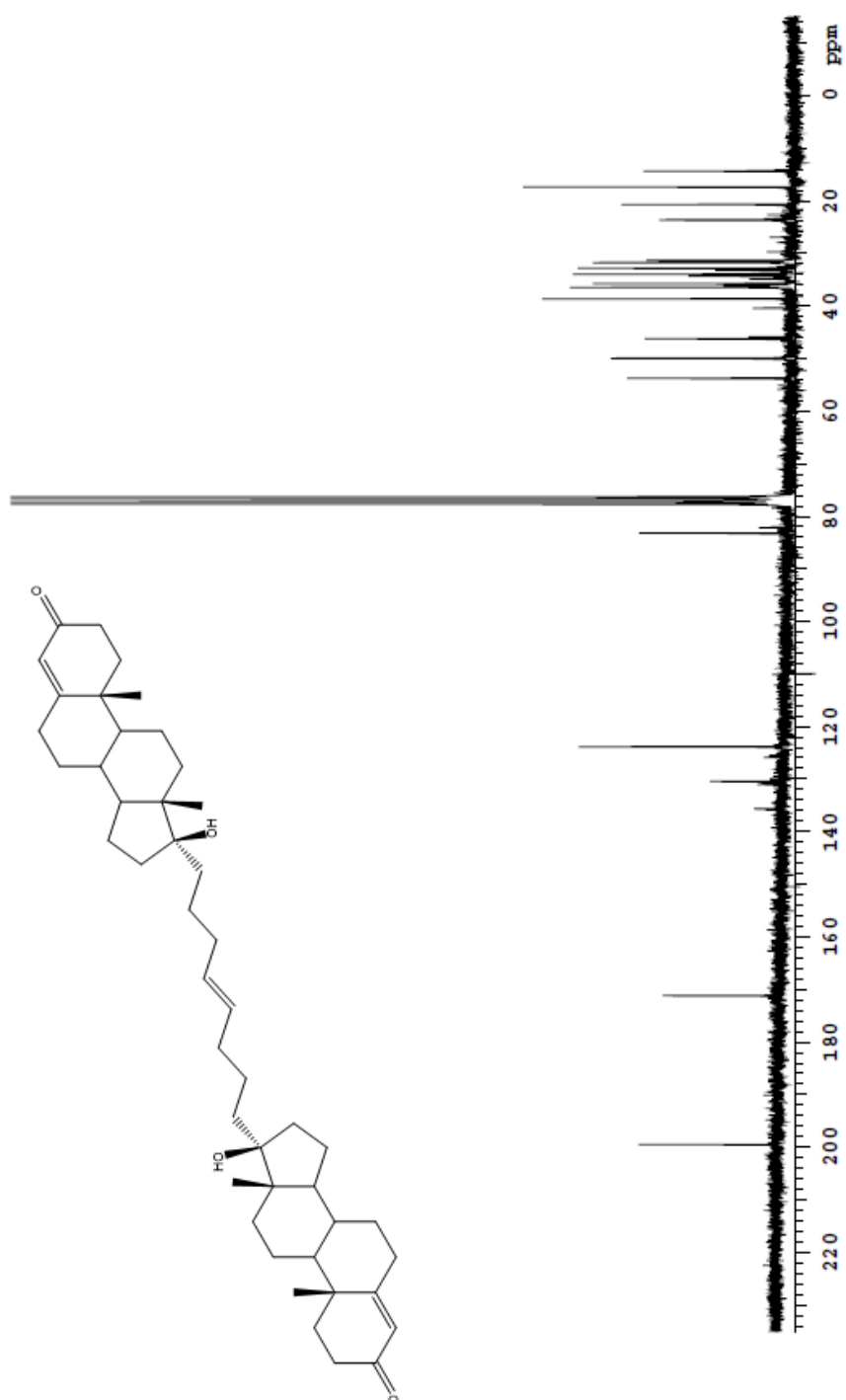
Spectre B2.20 RMN  $^{13}\text{C}$  du ((*E*)-17,17'-(hex-3-ène-1,6-diyl))bis(androst-4-èn-3-one-17 $\beta$ -ol) (**4<sub>2</sub>**)



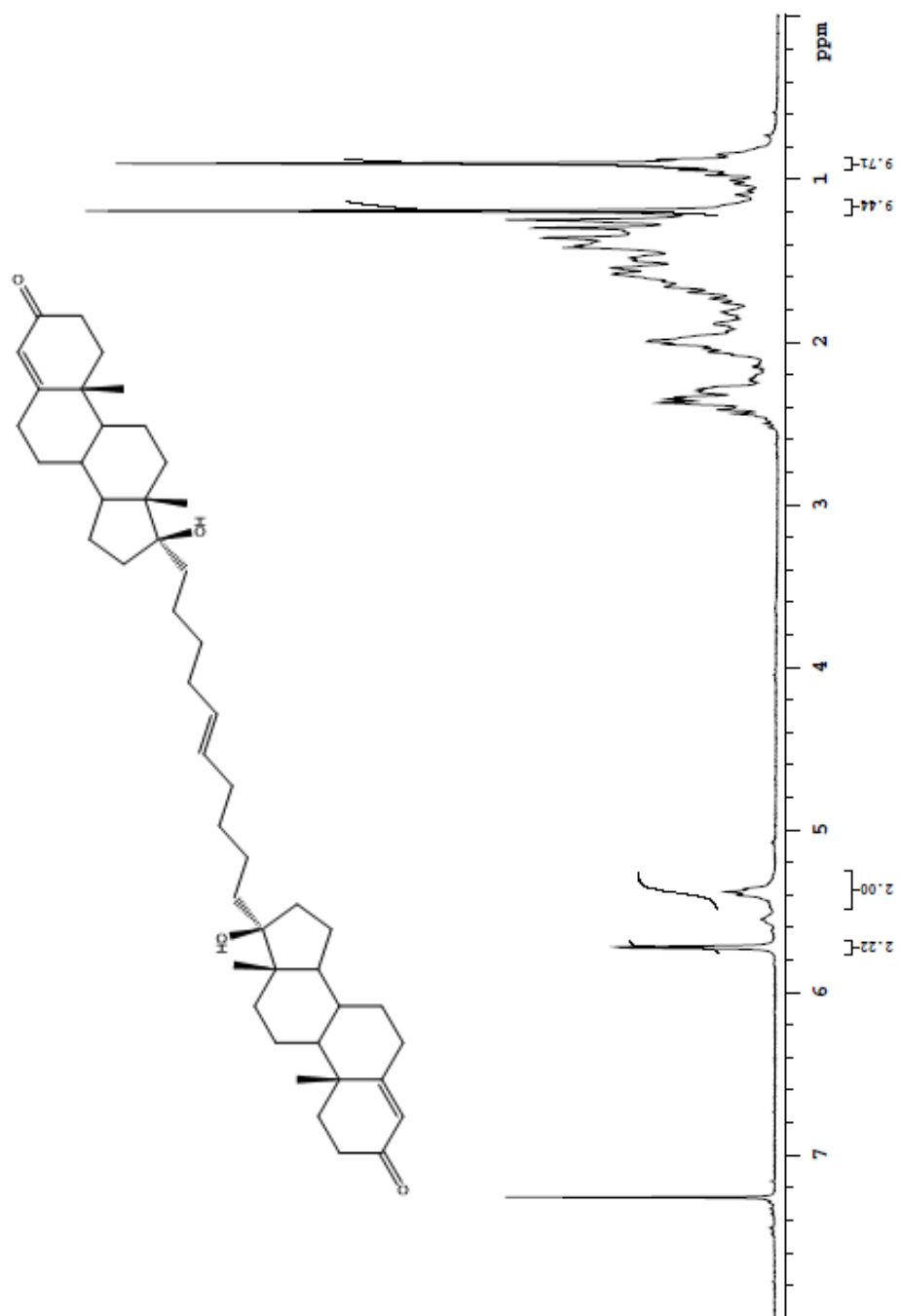
Spectre B2.21 RMN  $^1\text{H}$  du ((*E*)-17,17'-(oct-4-ène-1,8-diyl))bis(androst-4-èn-3-one-17 $\beta$ -ol) (43)



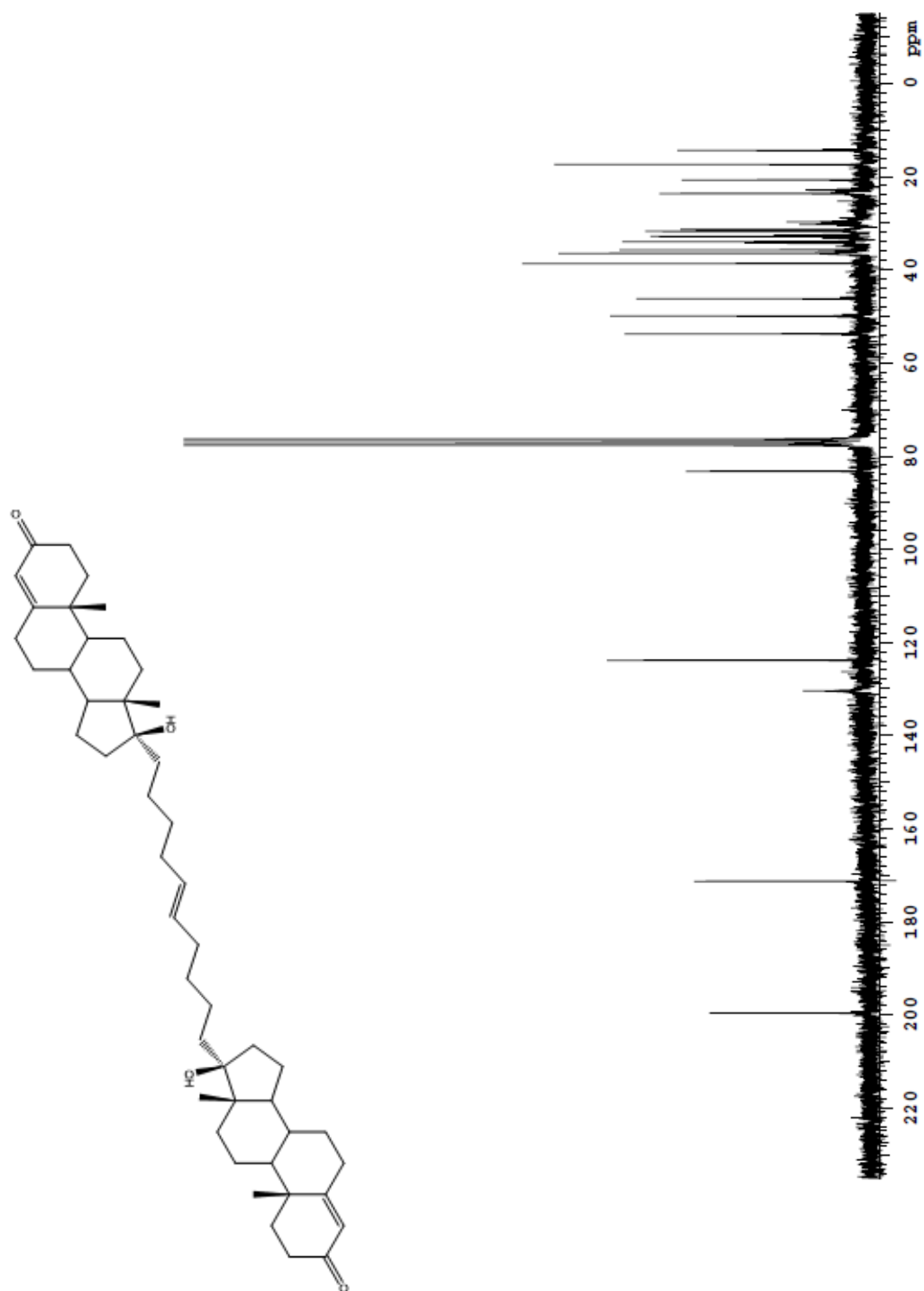
Spectre B2.22 RMN  $^{13}\text{C}$  du ((*E*)-17,17'-(oct-4-ène-1,8-diyl))bis(androst-4-èn-3-one-17 $\beta$ -ol) (43)



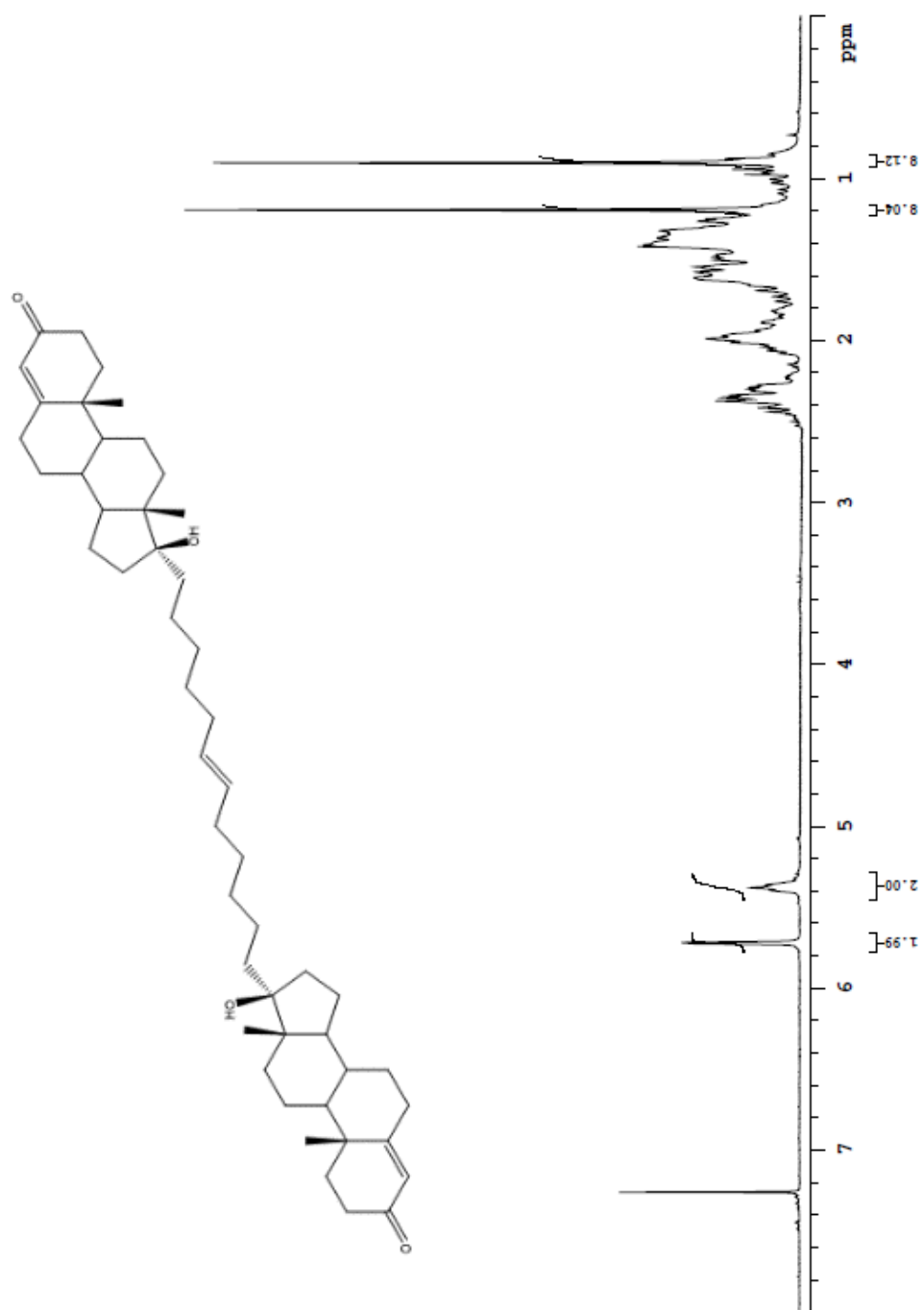
Spectre B2.23 RMN  $^1\text{H}$  du ((*E*)-17,17'-(déca-5-ène-1,10-diyl))bis(androst-4-èn-3-one-17 $\beta$ -ol) (44)



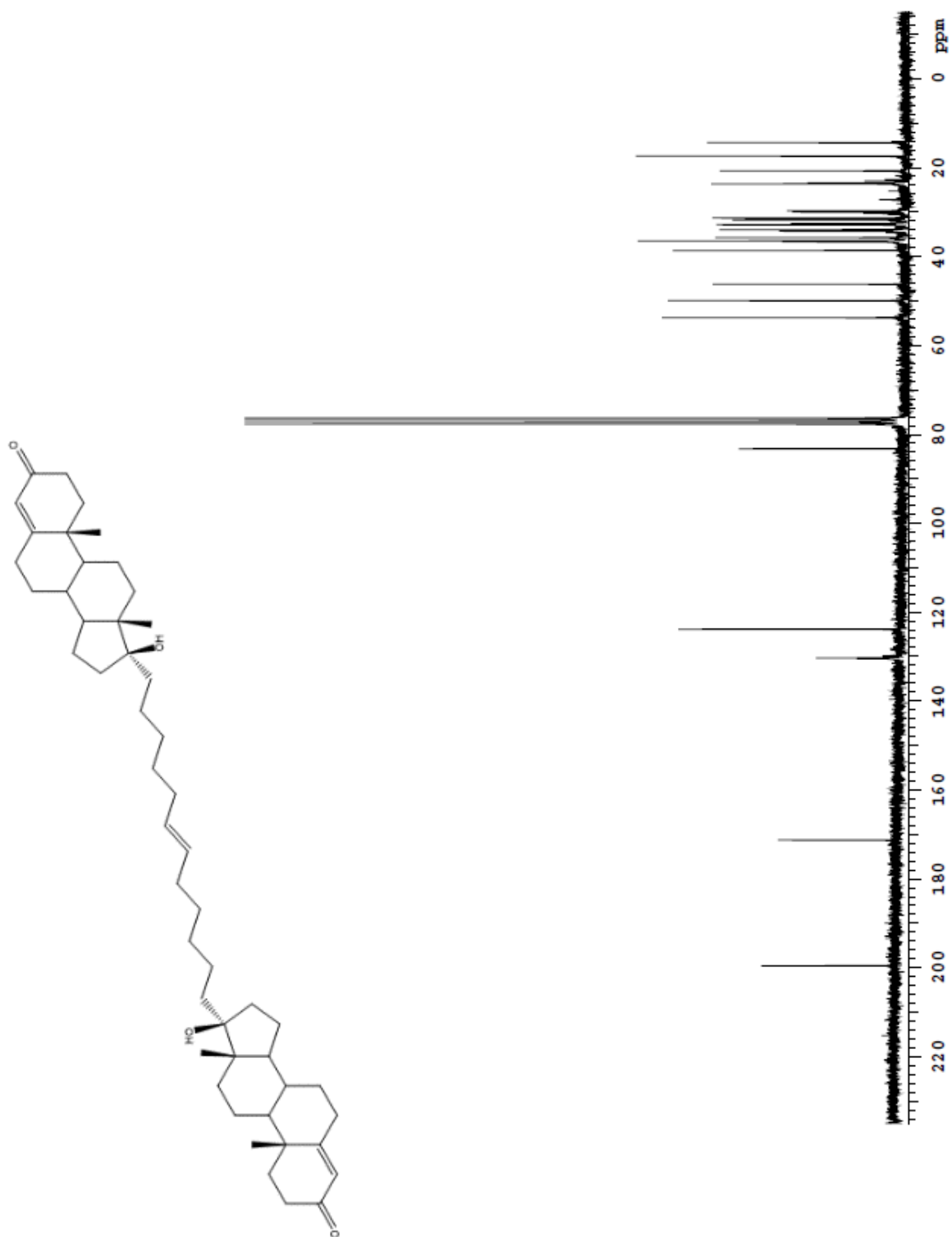
Spectre B2.24 RMN  $^{13}\text{C}$  du ((*E*)-17,17'-(déca-5-ène-1,10-diyl))bis(androst-4-èn-3-one-17 $\beta$ -ol) (44)



Spectre B2.25 RMN  $^1\text{H}$  du ((*E*)-17,17'-(dodéca-6-ène-1,12-diyl))bis(androst-4-èn-3-one-17 $\beta$ -ol) (**4s**)

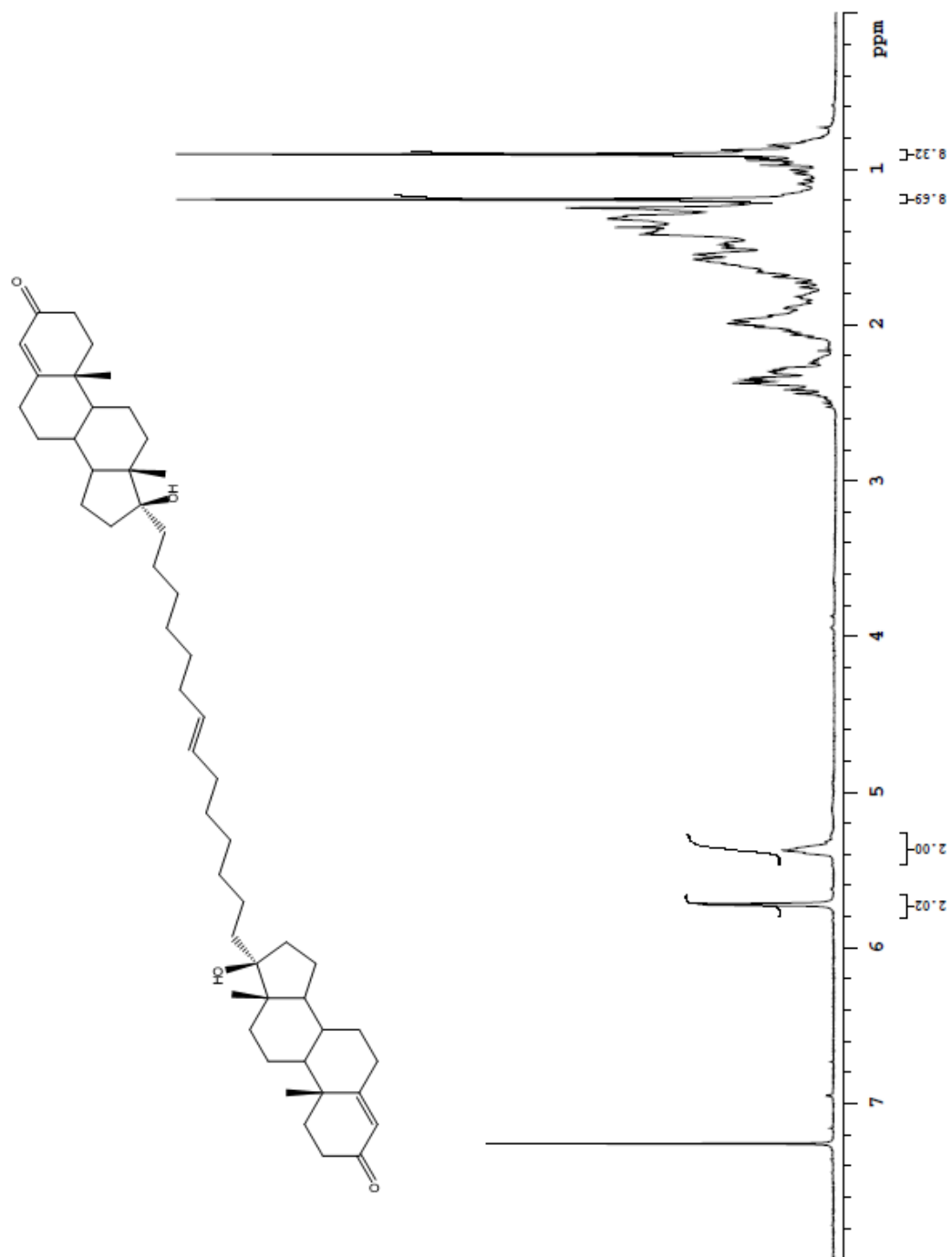


Spectre B2.26 RMN  $^{13}\text{C}$  du ((*E*)-17,17'-(dodéca-6-ène-1,12-diyl))bis(androst-4-èn-3-one-17 $\beta$ -ol) (**4s**)

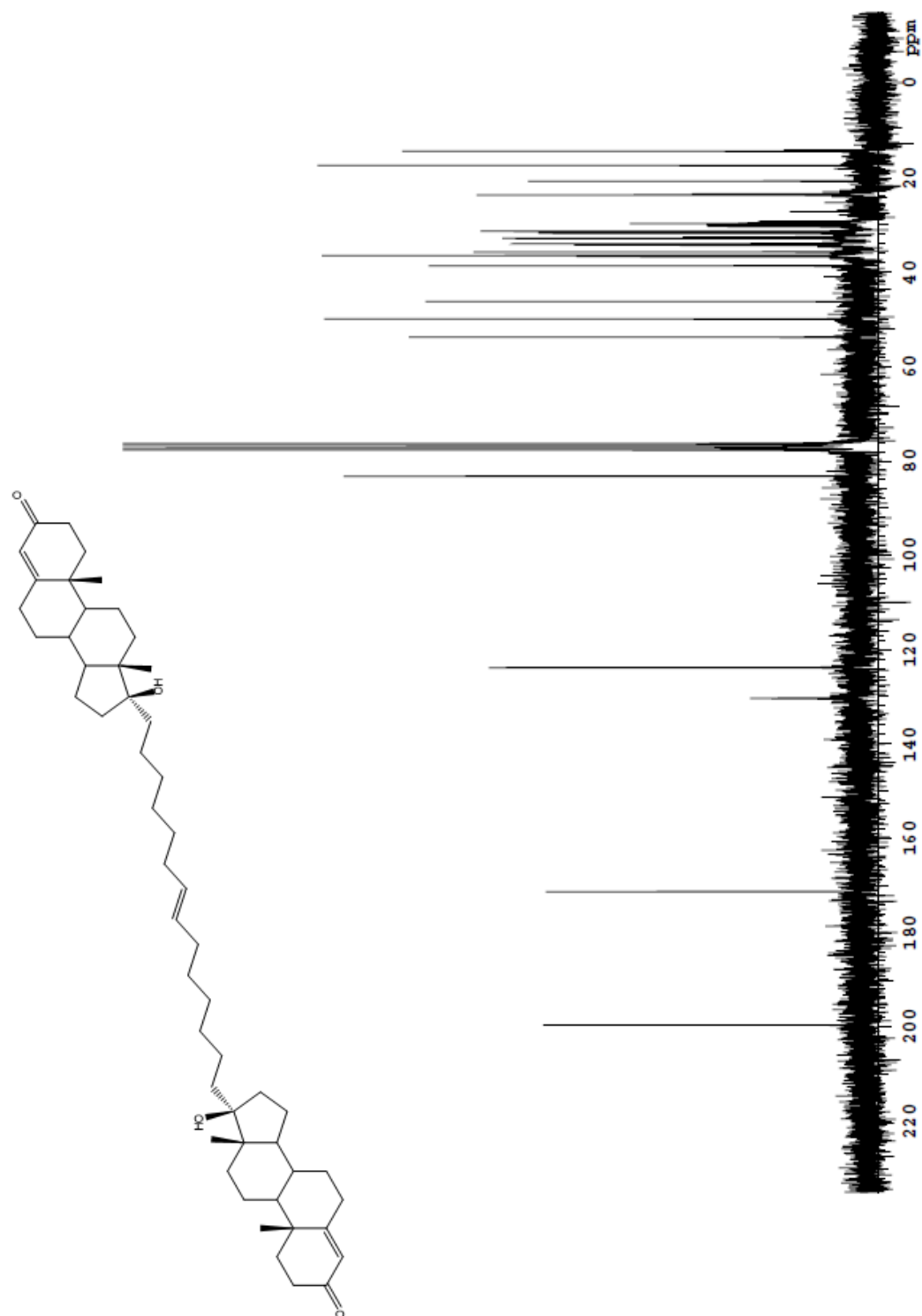


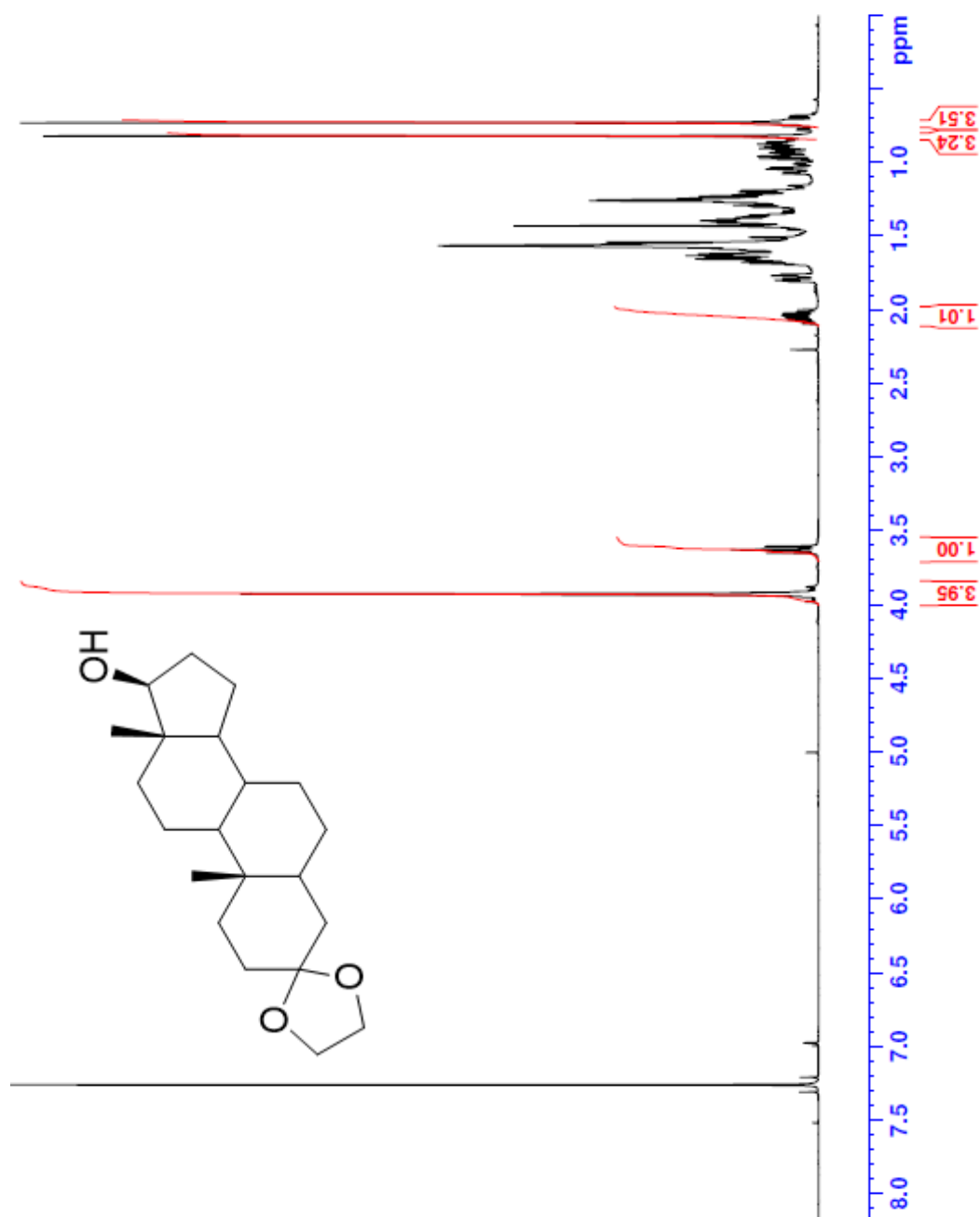


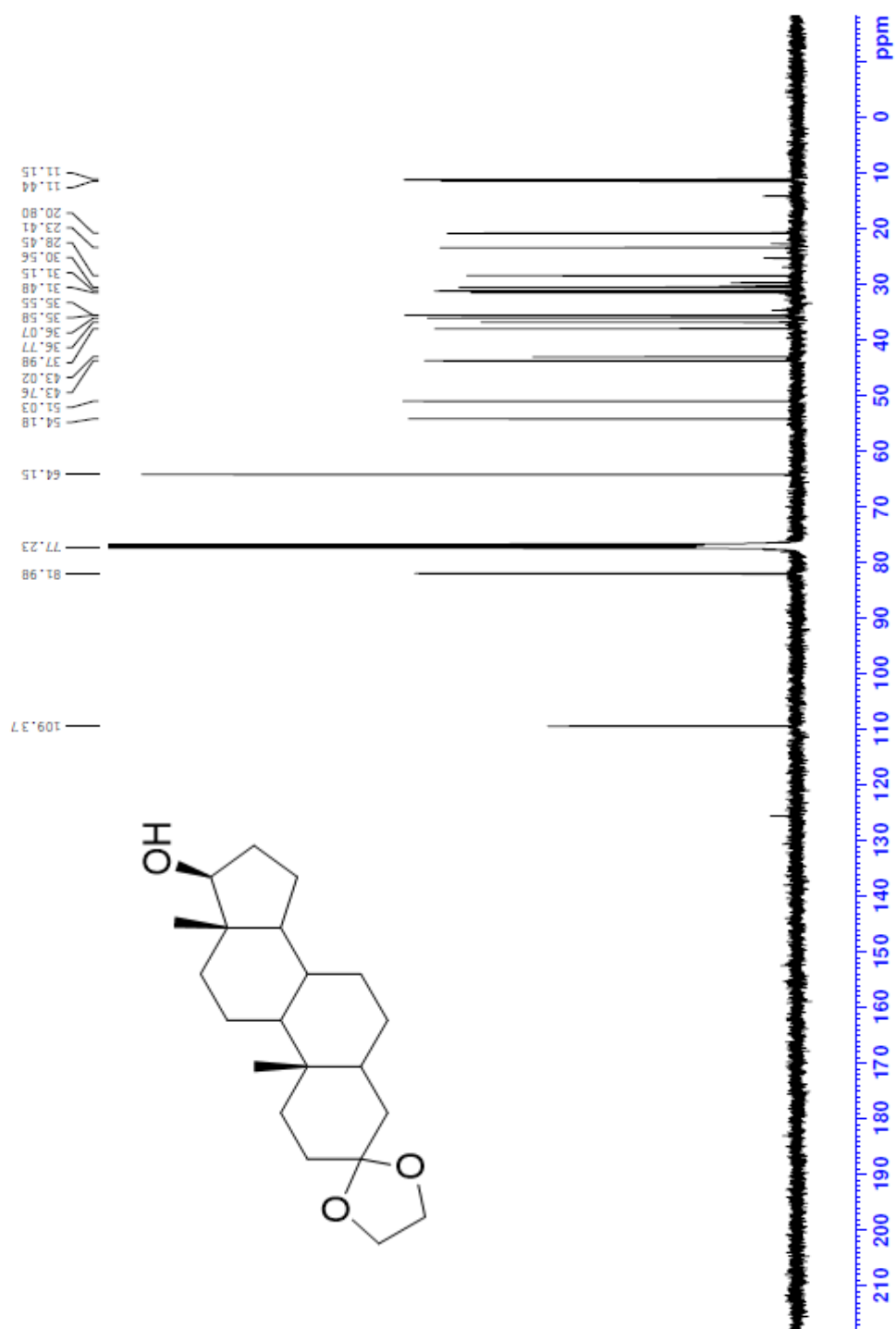
Spectre B2.27 RMN  $^1\text{H}$  du ((*E*)-17,17'-(tétradéca-7-ène-1,14-diyl))bis(androst-4-èn-3-one-17 $\beta$ -ol) (**46**)

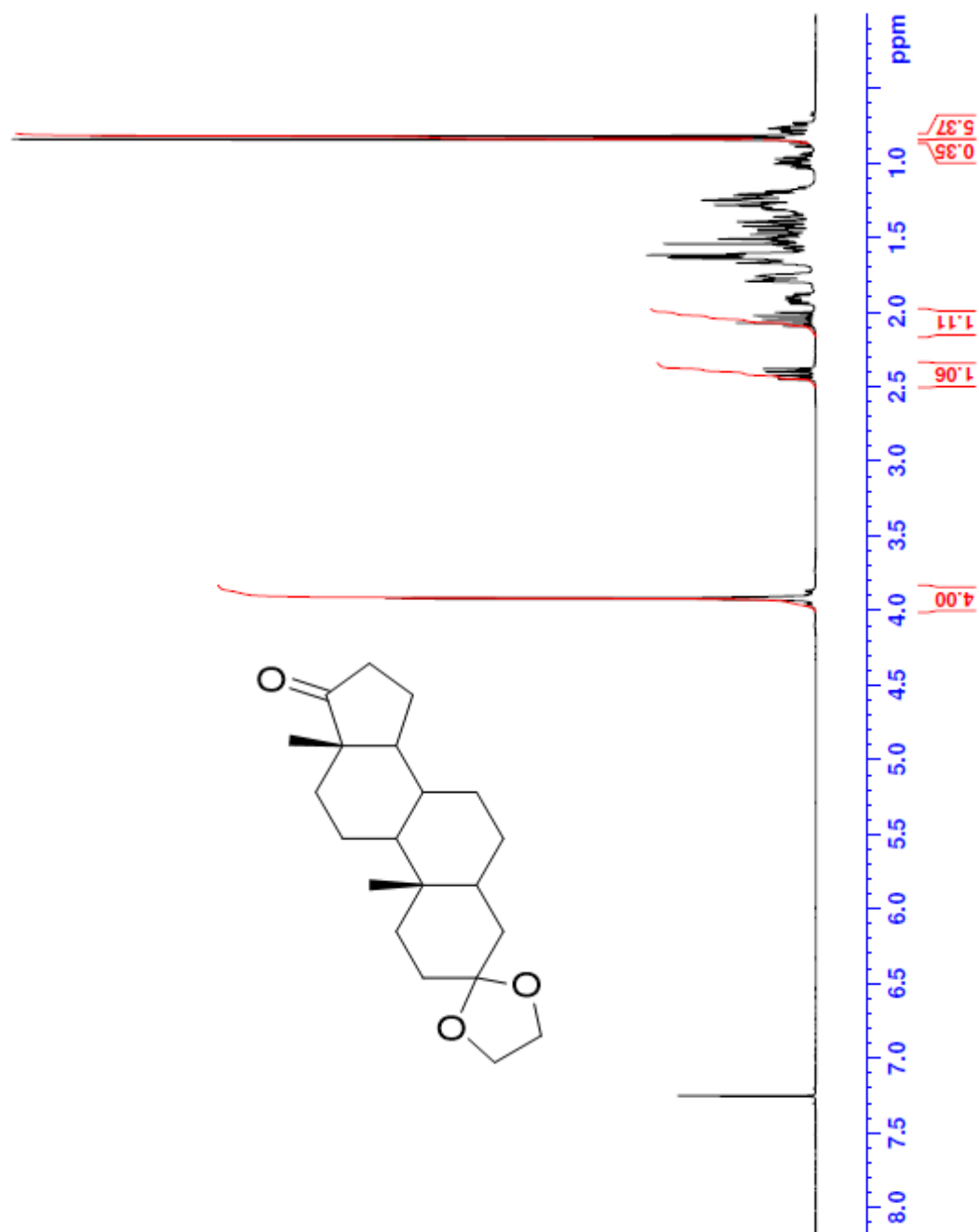


Spectre B2.28 RMN  $^{13}\text{C}$  du ((*E*)-17,17'-(tétradéca-7-ène-1,14-diyl))bis(androst-4-èn-3-one-17 $\beta$ -ol) (**46**)

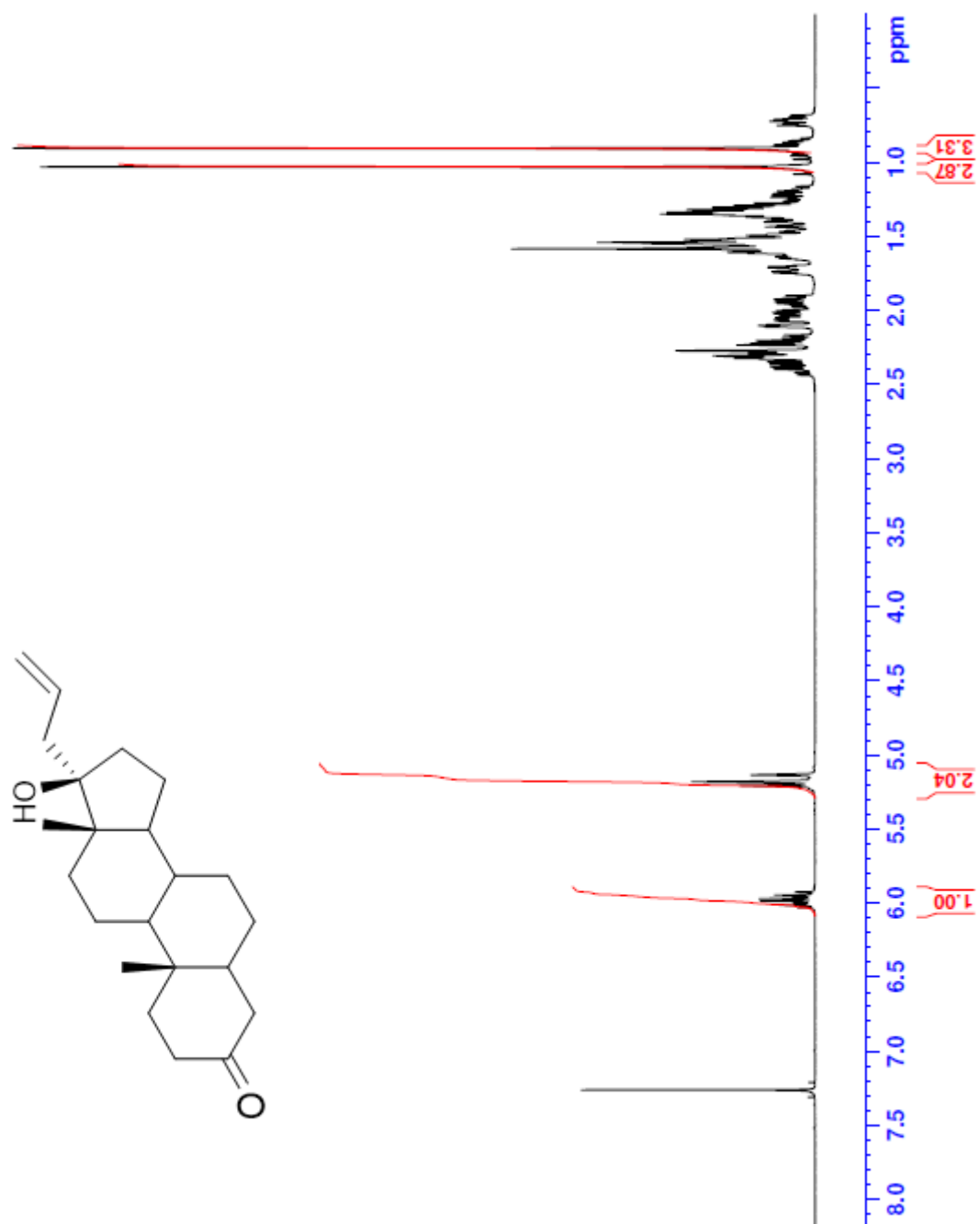


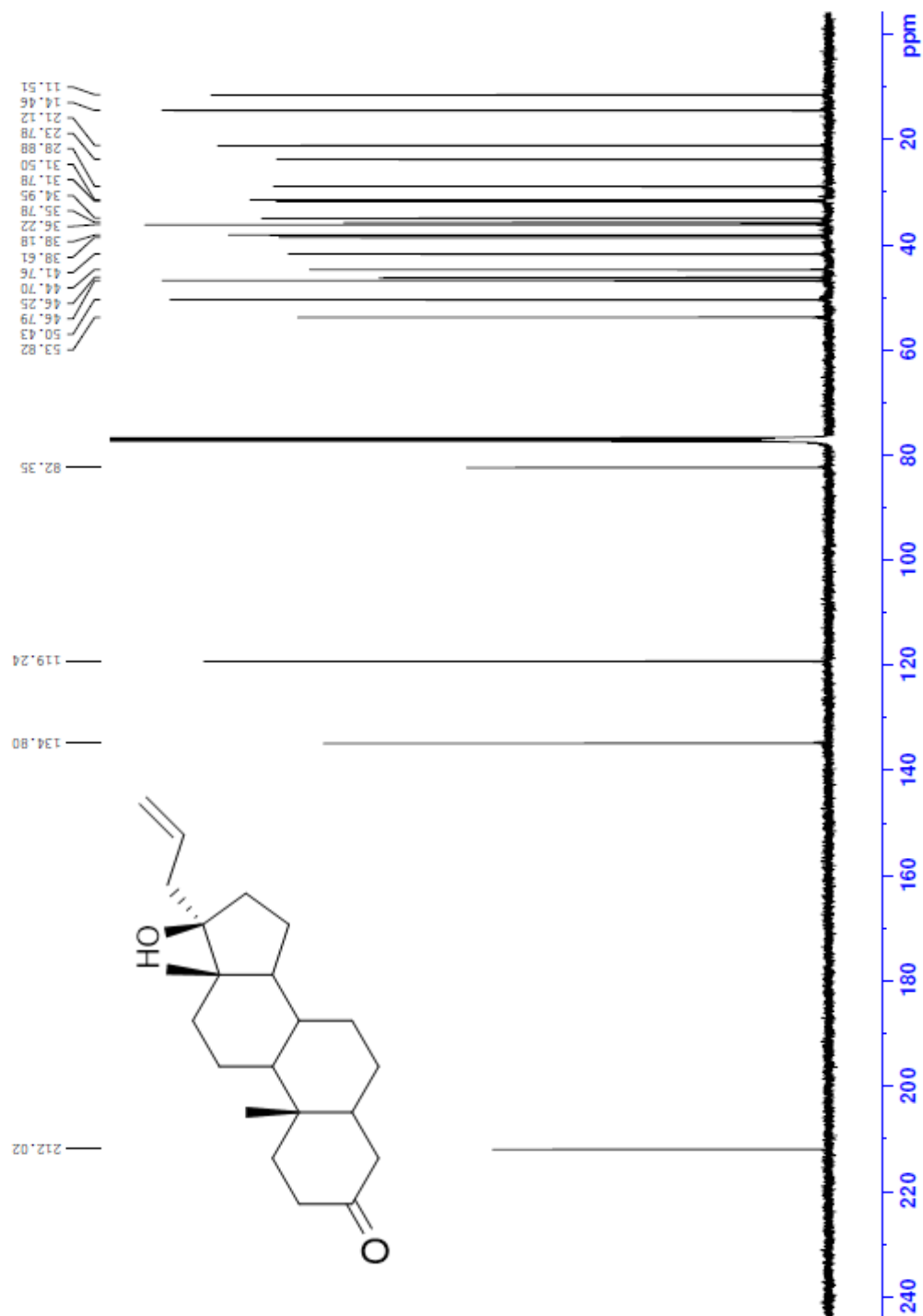
Spectre B2.29 RMN  $^1\text{H}$  de l'androst-17 $\beta$ -ol spiro-(1,3)dioxolane (5)

Spectre B2.30 RMN  $^{13}\text{C}$  de l'androst-17 $\beta$ -ol spiro-(1,3)dioxolane (5)

Spectre B2.31 RMN  $^1\text{H}$  de l'androst-17-one spiro-(1,3)dioxolane (6)

Spectre B2.32 RMN  $^{13}\text{C}$  de l'androst-17-one spiro-(1,3)dioxolane (6)

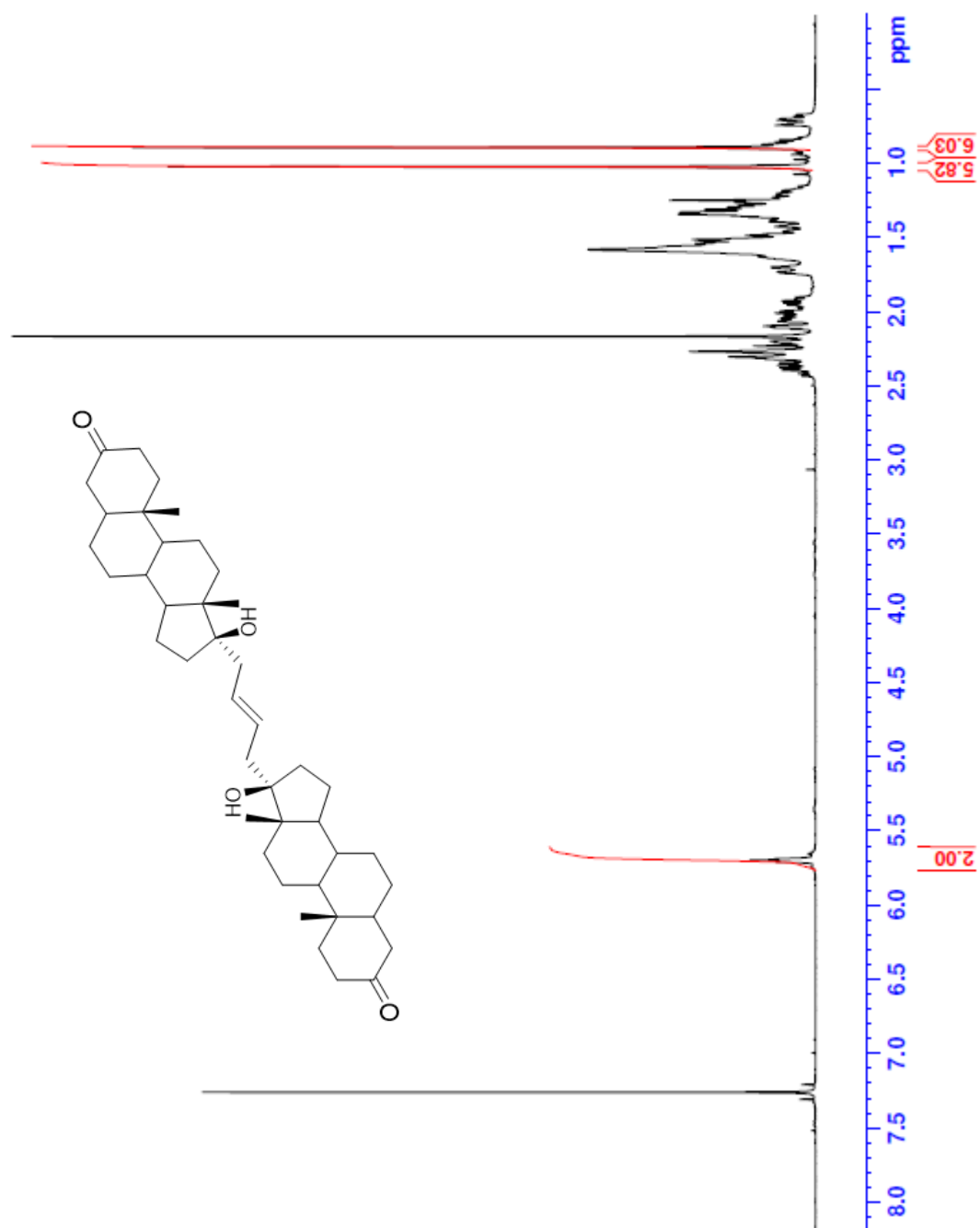
Spectre B2.33 RMN  $^1\text{H}$  du  $17\alpha$ -allyl-androst-3-one- $17\beta$ -ol (7)

Spectre B2.34 RMN  $^{13}\text{C}$  du  $17\alpha$ -allyl-androst-3-one- $17\beta$ -ol (7)

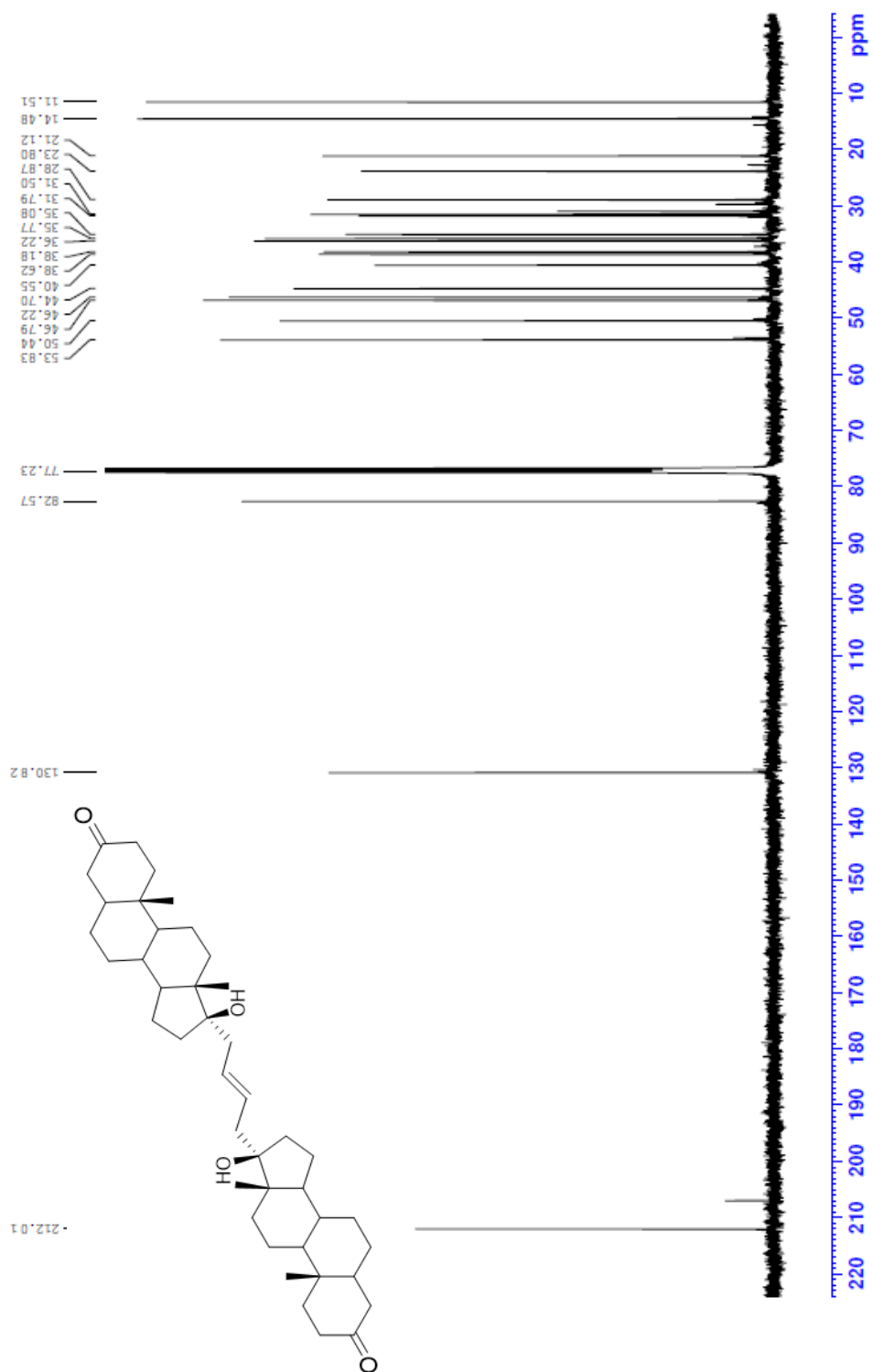


Spectre B2.35 RMN  $^1\text{H}$  du ((*E*)-17,17'-(but-2-ène-1,4-diyl))bis(androst-3-one-17 $\beta$ -ol)

(8)



Spectre B2.36 RMN  $^{13}\text{C}$  du ((*E*)-17,17'-(but-2-ène-1,4-diyl))bis(androst-3-one-17 $\beta$ -ol) (**8**)



## APPENDICE A

### ARTICLE COMPLÉMENTAIRE

Cet appendice contient un article complémentaire découlant des travaux réalisés dans le cadre de mon projet de maîtrise. L'article s'intitule : « *Recent Advances in the Use of the Dimerization Strategy as a Means to Increase the Biological Potential of Natural or Synthetic Molecules* ». Il s'agit d'un article de revue explicitant les avancées réalisées dans le domaine de l'études des molécules dimériques au cours des 10 dernières années. Ces travaux sont publiés dans le journal scientifique *Molecules*, **26**, 2021, 2340.

<https://doi.org/10.3390/molecules26082340>

Review

# Recent Advances in the Use of the Dimerization Strategy as a Means to Increase the Biological Potential of Natural or Synthetic Molecules

 Alexis Paquin <sup>1,2</sup>, Carlos Reyes-Moreno <sup>2,3</sup> and Gervais Bérubé <sup>1,2,\*</sup>
<sup>1</sup> Department of Chemistry-Biochemistry and Physics, University of Québec at Trois-Rivières, C.P. 500, Trois-Rivières, QC G9A 5H7, Canada; Alexis.Paquin@uqtr.ca

<sup>2</sup> Groupe de Recherche en Signalisation Cellulaire, University of Québec at Trois-Rivières, C.P. 500, Trois-Rivières, QC G9A 5H7, Canada; Carlos.Reyes-Moreno@uqtr.ca

<sup>3</sup> Department of Medical Biology, University of Québec at Trois-Rivières, C.P. 500, Trois-Rivières, QC G9A 5H7, Canada

\* Correspondence: Gervais.Berube@uqtr.ca

**Abstract:** The design of  $C_2$ -symmetric biologically active molecules is a subject of interest to the scientific community. It provides the possibility of discovering medicine with higher biological potential than the parent drugs. Such molecules are generally produced by classic chemistry, considering the shortness of reaction sequence and the efficacy for each step. This review describes and analyzes recent advances in the field and emphasizes selected  $C_2$ -symmetric molecules (or axial symmetric molecules) made during the last 10 years. However, the description of the dimers is contextualized by prior work allowing its development, and they are categorized by their structure and/or by their properties. Hence, this review presents dimers composed of steroids, sugars, and nucleosides; known and synthetic anticancer agents; polyphenol compounds; terpenes, known and synthetic antibacterial agents; and natural products. A special focus on the anticancer potential of the dimers transpires throughout the review, notwithstanding their structure and/or primary biological properties.

**Keywords:** antitumor agents; biological activity;  $C_2$ -symmetry; dimers; drug design; synthesis



**Citation:** Paquin, A.; Reyes-Moreno, C.; Bérubé, G. Recent Advances in the Use of the Dimerization Strategy as a Means to Increase the Biological Potential of Natural or Synthetic Molecules. *Molecules* **2021**, *26*, 2340. <https://doi.org/10.3390/molecules26082340>

Academic Editor: Nicola Micale

Received: 16 March 2021

Accepted: 14 April 2021

Published: 17 April 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

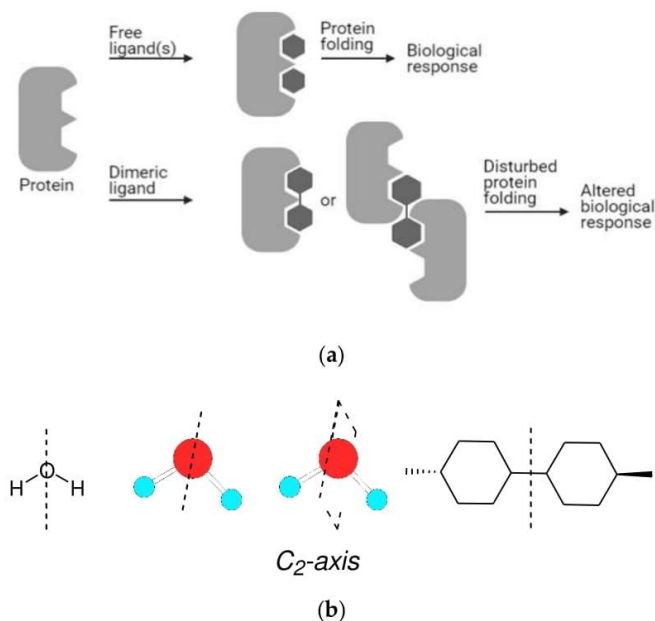


**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

The synthesis of dimeric molecules has attracted considerable attention over the years. Dimers of biologically active molecules quite often show higher activity than the monomeric unit [1]. Many biological receptors or targets, once activated, dimerize upon an initial interaction with a drug. Thus, a dimer that could interact with such targets was imagined to be able to produce a stronger biological response than the parent drug. A dimeric drug could accommodate two independent binding sites on a receptor molecule, leading to a thermodynamically stronger interaction than that obtained by the attachment of two monomeric drugs (Figure 1a) [2,3]. Hence, this strategy was exploited for the construction of many types of drugs for the discovery of cutting-edge and innovative therapeutics.

The motivation for the design of dimers evolves from the fact that in natural products, molecular bilateral symmetry is found in about 7% of all isolated molecules, which represents a higher number than that estimated on coincidence [4]. Particularly, the  $C_2$ -axis represents 69% of the total number of naturally occurring dimers. Generally, the biosynthesis of dimeric natural molecules occurs by a head-on approach of two identical units. So once again, Mother Nature inspires researchers to construct symmetrical therapeutic molecules [4]. Figure 1b displays this particular type of  $C_2$  symmetry (sigma plane or axis) that is often utilized by researchers to construct dimeric molecules. This topic was the subject of several reviews in the field of anticancer drugs [5], in the field of steroids [6], and recently as bioactive oligovalent symmetrical molecules [7].



**Figure 1.** (a) Schematic representation of a dimeric molecule interacting with its receptor and biological outcome. (b) Schematic representations of  $C_2$ -sigma plane or  $C_2$ -axis symmetry using small molecules.

Herein, we describe the most recent advances in this rich and vast research domain with a focus on the last decade (2010–2020). This review is divided into important types of biologically active molecules and emphasis on the earlier work that allowed the development of the reported dimers. The selection of the topics was based on recently reported studies in the literature. This review is divided into the following sections: steroids dimers and non-steroidal analogues, sugars and nucleoside-based dimers, dimers of known and synthetic anticancer agents, polyphenol dimers, terpenoid dimers, dimers of known and synthetic antibacterial agents, and recently isolated dimeric natural products. The molecules are categorized by their respective types to contrast the original medicinal properties with that of the corresponding dimers. Furthermore, the different sections were also selected as the authors of the studies express the need for designing a dimer to improve the activity of the basic molecules. The selection of compounds was also guided by the relevance of the described biological data.

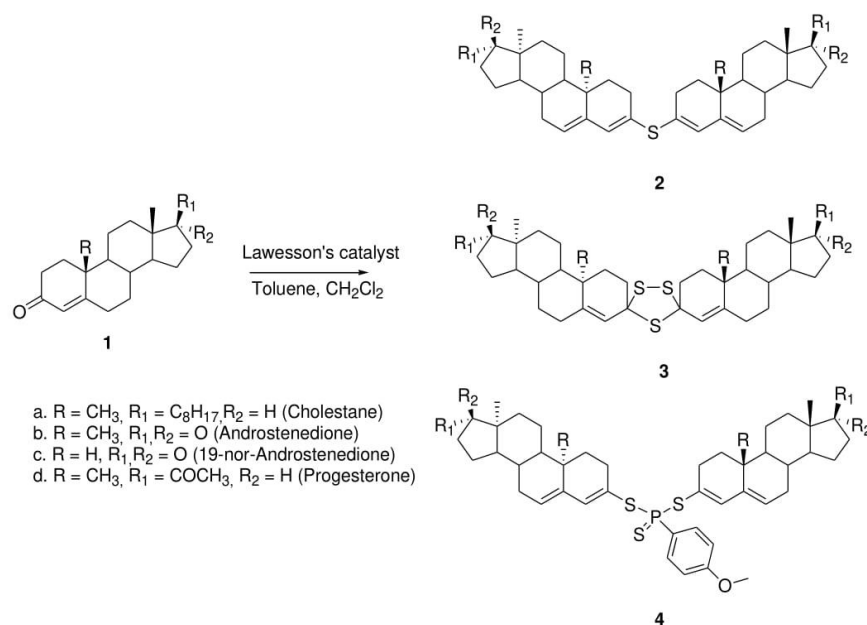
It is important to specify that dimeric drugs are mainly intended to link two receptors, inhibiting the usual response to a ligand and frequently synergizing this response. Some dimeric molecules can be made to alkylate DNA inhibiting cell growth. The design of dimers will be guided by the intended molecular target. Most often, dimeric drugs are not released (or cleaved) within the cellular component of the cell, so they can act as a completely new molecular unit inside the targeted cells. Furthermore, such dimers are not meant to follow Lipinski's rule of five, which applies to small molecular entities.

## 2. Steroids Dimers and Non-Steroidal Analogs

Steroids play an important biological role in nature. Hence, the dimerization strategy was applied to steroids with the goal of improving their biological potential. Several dimers were fabricated by reaction of steroidal compounds (**1a–d**) with Lawesson's catalyst [8]. According to the reaction conditions, different proportions of the dimers **2**, **3**, and **4** with distinct linkers were isolated and characterized (Figure 2). These dimers were tested for their biological activity and the results showed the dimer with a sulfur ether bridge, the bis(cholesta-3,5-dien-3-yl) sulfide **2**, was the most active compound [9]. The doses having



antiproliferative activity of this particular sulfide on cervical cancer (HeLa), breast cancers (MDA-MB-453 and MDA-MB-361), and leukemia (K562) human cell lines ranged from 14.9 to 27.1  $\mu\text{M}$  in comparison to cisplatin, ranging from 2.1 to 17.1  $\mu\text{M}$ . The dimeric compounds showed no antimicrobial activity; however, those linked with trithiolane ring system **3** exhibited antifungal activity against *Saccharomyces cerevisiae*. Despite the fact that the dimers are interesting molecules, the synthesis is rather difficult as it leads to a complex mixture of compounds.

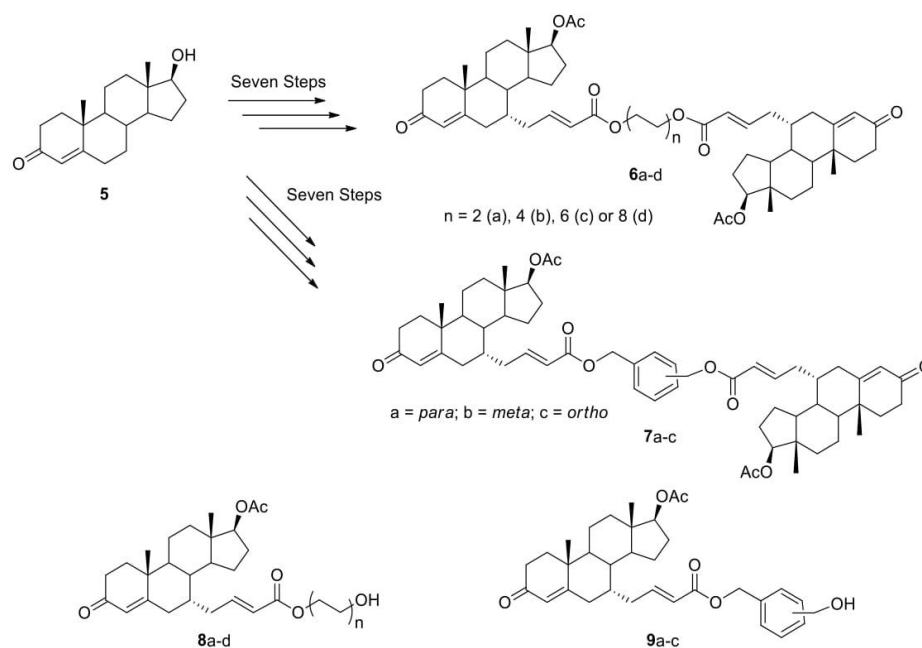


**Figure 2.** Synthesis of symmetric (**3,4**) and asymmetric (**4**) steroid dimers with a sulfur-based bridge.

In another study, Vesper et al. reported the synthesis of novel  $\text{C}_2$ -symmetric testosterone dimers were linked at position  $7\alpha$  of the steroid nucleus [10]. Two series of dimers were constructed from testosterone (**5**) using either a  $\alpha,\omega$ -aliphatic diol or an aromatic regioisomeric diol (*ortho*, *meta*, or *para*) as tether chains to produce dimers **6a–d** and **7a–c**, respectively (Figure 3). The dimers were constructed in a stepwise manner via the corresponding ester units **8a–d** and **9a–c**, allowing comparison of the antiproliferative activity with the final dimers. The most active dimer **6a** ( $n = 1$ ) showed an  $\text{IC}_{50}$  of 3.8, 1.4, and 1.8  $\mu\text{M}$  on LNCaP (AR+), DU-145 (AR−), and PC3 (AR−) prostate cancer cell lines, respectively. This level of activity is about 12, 70, and 40 times more powerful than that of cyproterone acetate, a known antiandrogen used as the control drug. Interestingly, the precursor **8a** was also active with an  $\text{IC}_{50}$  of 57  $\mu\text{M}$  for LNCaP cells, 120  $\mu\text{M}$  for DU-145 cells, and 132  $\mu\text{M}$  for the PC3 cells. Dimers **6c–d** were less active than dimer **6a** but displayed selectivity on androgen-dependent LNCaP prostate cancer cells. Unfortunately, dimers **7a–c** were not tested in this study.

Comparative investigations of testosterone dimers **6b** and **7a** with similar chain lengths were recently performed in our laboratory [11–15]. The interactions with several bio-macromolecules were studied using various spectroscopic methods, transmission electron microscopy (TEM), as well as molecular modeling. The first study showed that beta-lactoglobulin was able to encapsulate testosterone readily in comparison with the dimers **6b** and **7a**. The binding affinity for beta-lactoglobulin was higher for testosterone with a binding constant of  $5.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  than **7a** with  $2.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  and **6b** with  $4.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  [11]. These dimers can also bind human serum albumin (HSA) and bovine serum albumin (BSA), proteins able to transport biological substrates and drugs [12,13].

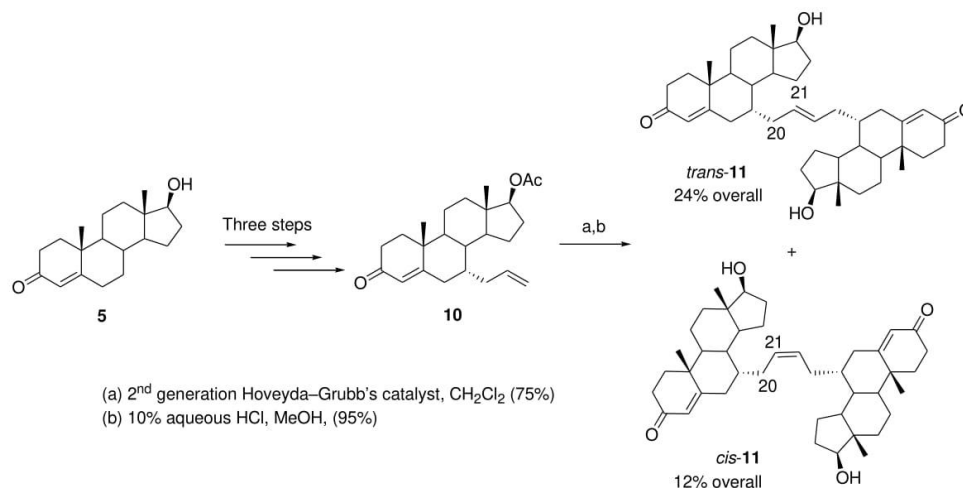
The dimers could also alter DNA and tRNA morphology [14,15]. These investigations provide further insight into the nature of steroid–biological macromolecule interactions and demonstrate the value of designer dimers.



**Figure 3.** Synthesis of C<sub>2</sub>-symmetric testosterone dimers **6a–d** and **7a–c** by esterification reaction and their precursor's **8a–d** and **9a–c**.

Bastien et al. reported the synthesis of two testosterone dimers [16]. They are readily available from testosterone (5) through an efficient five-step synthetic path with an overall yield of 36% (*trans*-11, 24% and *cis*-11, 12%) (Figure 4). The key dimerization step involved an olefin metathesis reaction of 7 $\alpha$ -allyltestosterone acetate (10) with the Hoveyda–Grubbs second-generation catalyst. The isomeric dimers were easily separable by flash chromatography (*trans* and *cis*, 2:1). X-ray diffraction crystallography confirmed the structure of the minor *cis* isomer and indirectly proved the structure of the major *trans* isomer. MTT assays showed that the *cis* dimer had the best activity against human prostate cancer cell lines. *cis*-11 with an IC<sub>50</sub> of 30.3  $\mu$ M and 24.7  $\mu$ M on LNCaP prostate cancer cells (AR+) and PC3 (AR–), respectively, displayed similar activity to that of the known antiandrogen cyproterone acetate. Interestingly, the *trans*-11 was active only on androgen-independent PC3 cancer cells.

In Denisov et al., the dimers were used to study allosteric effects in substrate binding to cytochrome P450 CYP3A4 by resonance Raman and UV-Vis spectroscopy [17]. This work shows that both dimers bind to the catalytic binding site of CYP3A4, which is known to be sufficiently flexible to accommodate structurally different substrates. It was discovered that the *cis*-11 binds more tightly and induces about 100% spin shift due to its compact structure. In comparison, the *trans*-11 is a larger molecule that binds similarly to two monomeric testosterone as it exhibits comparable spectral (resonance Raman (rR) spectroscopy) properties and binding affinity. This study provided the first direct evidence for an allosteric effect of the peripheral binding site at the protein–membrane interface on the functional properties of CPY3A4.

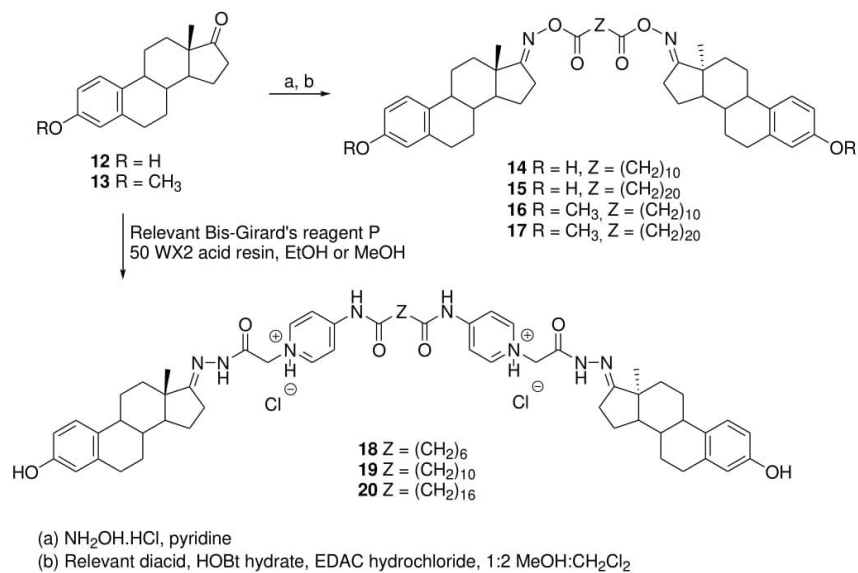


**Figure 4.** Synthesis of 7 $\alpha$ -allyl testosterone acetate (**10**) and testosterone dimers *trans*-**11** and *cis*-**11** via an olefin metathesis reaction.

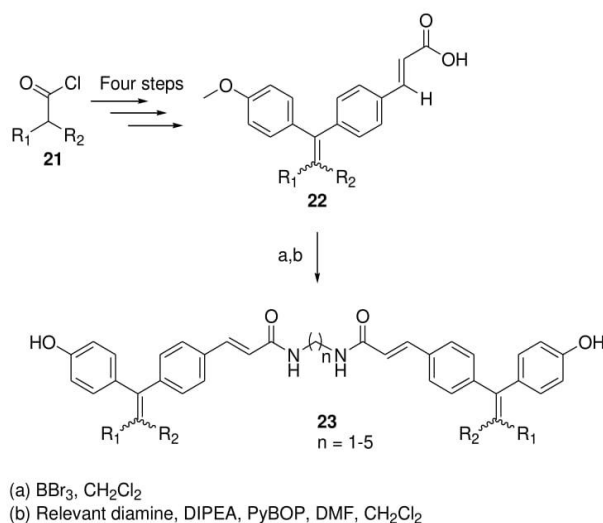
In order to modulate estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ )-mediated transcription events, Wendlant et al. developed a series of symmetric estrogen dimers linked at position C-17 [18]. The first series of dimers, comprised of compounds **14** to **17**, was fabricated through the use of oxime chemistry [19] by starting from estrone **12** or estrone 3-methyl ether **13** (Figure 5). A stability analysis was conducted and proved that the dimers were robust under various conditions. However, all compounds were analyzed for their agonist affinity for ER $\alpha$  and none of them showed a superior affinity to that of 17 $\beta$ -estradiol. In response to those results, dimers **18**, **19**, and **20** were synthesized in the hope of increasing ER $\alpha$  affinity. Those compounds were fabricated via the use of a Girard-based linker, which increases the hydrophilicity of the targets. Of all these compounds, the dimer **19** showed the best results with a binding efficacy to ER $\alpha$  of about 125% compared with that of estrogen at optimal concentration. This dimer was also evaluated for its binding specificity and was found to link strongly to ER $\alpha$  whereas it was inactive against the three steroid hormone receptors, which include progesterone receptors (PR), androgen receptors (AR), and glucocorticoid receptors (GR). In vivo studies are still needed to evaluate the drug potential of this new candidate.

With the aim of modulating the activity of the estrogen receptor (ER), a recent approach consisted of designing C<sub>2</sub>-symmetric dimers to bridge both ligand binding sites of a dimeric ER [20]. In order to exploit this strategy, Knox et al. developed a series of cyclophenylacrylic acid dimers, which can downregulate the activity of ER [21]. The choice of structure for those dimers was based on crystallographic and theoretical studies [22,23]. The synthetic route to form those dimers is shown in Figure 6. Starting from the relevant acyl chloride **21**, a Friedel–Crafts acylation with anisole followed by a Grignard reaction with 4-bromobenzaldehyde protected as acetal results in a compound that can be treated with acid to deprotect the acetal and dehydrate the hydroxyl group, which forms the diphenyl core. Then, a Wittig–Horner reaction with trimethyl-/triethylphosphonoacetate and hydrolysis allows the formation of compound **22**. The anisole ring is then converted to phenol and a treatment of the resulting compound with DIPEA, PyBOP, and the corresponding diamine spacer results in the formation of **23**. Of all the derivatives formed in the study, two principal series can be distinguished: the first corresponds to a derivative of GW7604 [23], where R<sub>1</sub> is a phenyl group and R<sub>2</sub> is an ethyl group; the second series is composed of cyclophenyl derivatives [24], where R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub> are linked by a cyclohexyl ring. In both these series, the number of carbons of the diamine spacer varies between one and five.





**Figure 5.** Synthesis of estrogen dimers (18–20) possessing amide linkers at the C-17 position.



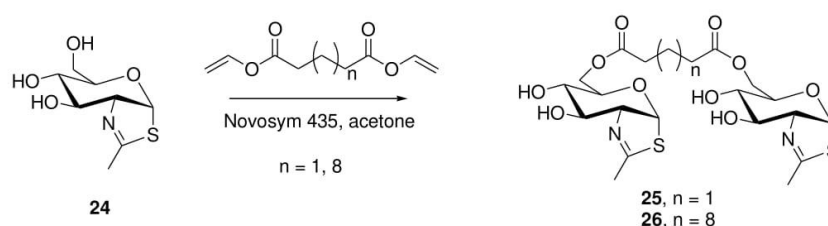
**Figure 6.** Synthesis pathway of the estrogen receptors antagonist (23) with corresponding starting materials (21).

All compounds were tested *in vitro* for biological activity [21]. A transactivation assay showed that all compounds possess full antagonistic potency against ER $\alpha$ / $\beta$ . The downregulative potential of the dimers was tested on the basis of ER $\alpha$  activity expressed in the MCF-7 cells and the results ranged from low to medium, every molecule being less potent than the reference drug fulvestrant, a known estrogen receptor antagonist. None of these compounds stimulated ER expression. The most active compound was the cyclofenil derivative that possesses a spacer containing four carbon atoms. Not only did this compound show the highest binding affinity to ER $\alpha$  with a relative binding affinity of 79.2% compared with fulvestrant, it also showed a downregulation efficacy of 38% at 1  $\mu$ M against the ER content of the MCF-7 cells, as determined by an *in-cell* Western immunoassay. These results showed once again that the strategy of dimerization as an

antagonist of a particular receptor may be an interesting method to synthesize novel medicinal compounds.

### 3. Sugars and Nucleoside-Based Dimers

Sugars are essential to life, not only as a source of energy, but also as a building block for several bio-macromolecules. An interesting enzymatic synthesis of several C-6-acylated derivatives of NAG-thiazoline **24** (2'-methyl- $\alpha$ D-glucopyrano-[2,1-d]- $\Delta$ 2'-thiazoline) was reported, and the products were tested for their inhibitory activities toward fungal  $\beta$ -N-acetylhexosamidase [25]. Amongst the products fabricated, two dimers were prepared by enzymatic transesterification of a suitable bis-vinylester and **24** using Novosym 435, a lipase from *Candida antarctica* immobilized on acrylic resin (Figure 7). The dimers **25** and **26** were obtained with 28% and 53% yield, respectively. The dimers were tested for their inhibitory activity on a fungal  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase, and unlike the parent compound **24**, a well-known competitive inhibitor of the enzyme, both dimers displayed mixed inhibitory effects.

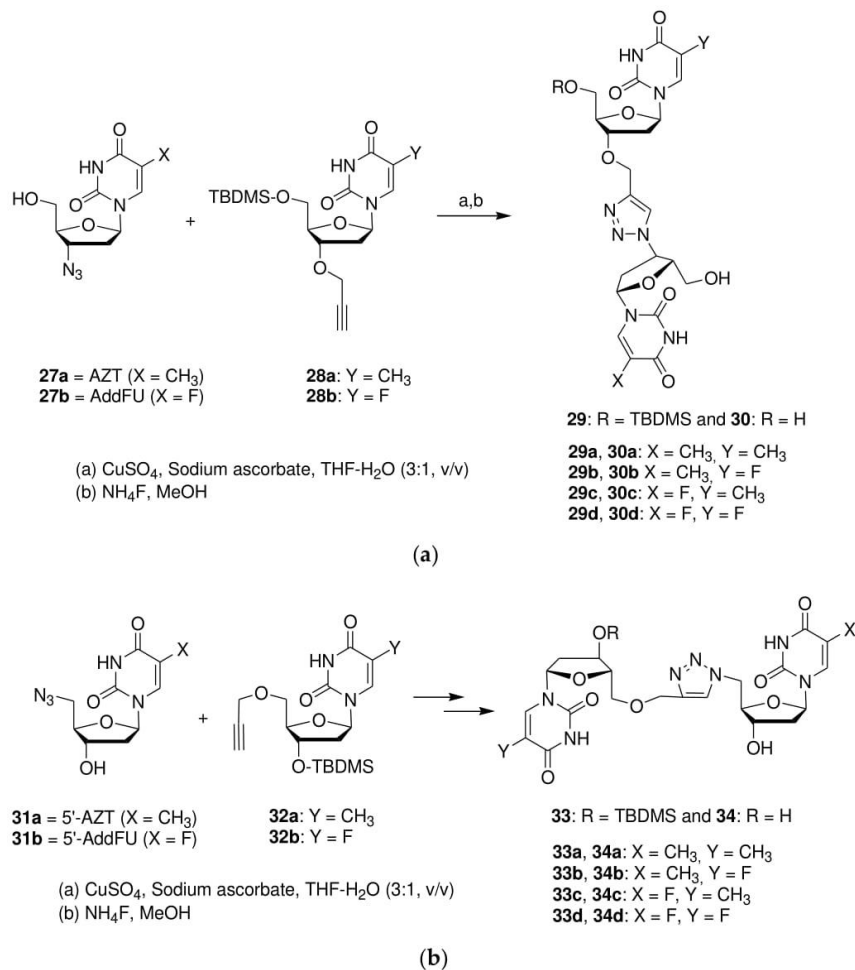


**Figure 7.** Enzymatic synthesis of NAG-thiazoline dimers **25** and **26**.

In a series of three recent publications, Barianiak et al. reported several nucleoside dimers analogues composed of floxuridine and thymidine linked by a 1,2,3-triazole ring system [26–28]. The target dimers are not symmetric but were designed as hybrid drugs with highly active antimetabolic building blocks. This research aimed at discovering compounds with enhanced biological activities. Particularly, the dimers could be used as nucleoside drugs, either by their chemical properties enabling them to terminate DNA synthesis or by their physical properties by disrupting the DNA helix. Overall, new anticancer drugs are sought by these researchers [26].

Two types of dimers were formed: in the first type, the dinucleosides are linked at 3'-3' position (**30a–d**); and the second type are connected at the 5'-5' position (**34a–d**) (Figure 8a,b). Hence, the relevant azides (**27a,b** or **31a,b**) and propargyl ethers (either **28a,b** or **32a,b**) are reacted together using the Huisgen cycloaddition reaction to produce excellent yields (70–90%) for the dimers (**29a–d** and **33a–d**) bearing a 1,2,3-triazole ring system. Treatment with ammonium fluoride produce the final dimers **30a–d** and **34a–d** with 75–95% yields. The triazole ring replaces the natural internucleotide phosphodiester linkage, leading to greater stability by increasing resistance to nuclease enzymes. In comparison with the phosphodiester bond, the triazole ring is neutral, allowing increased cell penetration and interactions with DNA and RNA due to the lack of electrostatic repulsion [26].

The impact on cell viability of dimers and precursors was tested on three types of human cancer cells; KB (carcinoma nasopharynx), HeLa (cervical cancer), and MCF-7 (breast cancer) using the colorimetric MTT assay. The results were compared with the nucleoside drug cytarabine (ara-C), with an internal standard 5-fluoro-2'-deoxyuridine (5-FdU), and with 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) as a control drug. It was discovered that dimer **34d** was the most active dimer with an  $\text{IC}_{50}$  of 3.10  $\mu\text{M}$  on KB cells, 3.46  $\mu\text{M}$  on MCF-7 cells, and 3.76  $\mu\text{M}$  on HeLa cells. Dimer **34d** was twice as active as 5-FdU and displayed equipotent activity to that of ara-C. Dimer **34a** was also interesting with an  $\text{IC}_{50}$  of 3.40, 4.11, and 5.06  $\mu\text{M}$  against HeLa, MCF-7, and KB cell lines, respectively. The 3'-3' connection was less effective in producing active dimers than the 5'-5' connection.

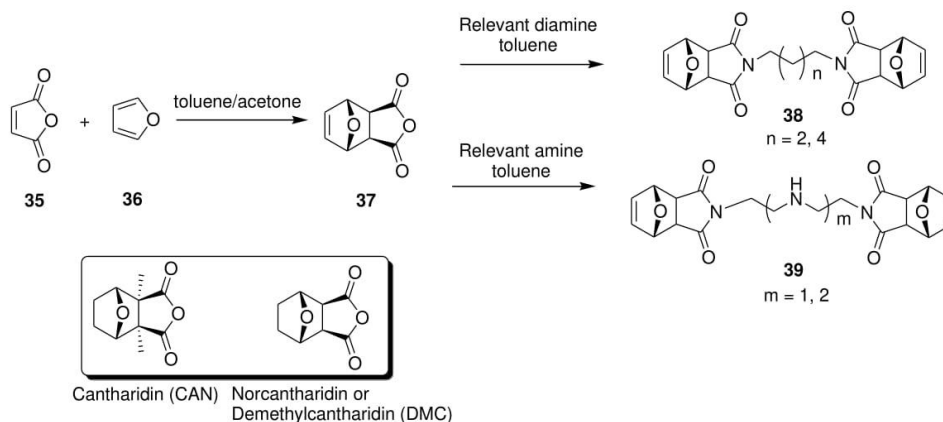


**Figure 8.** (a) Click chemistry synthesis of dimers **30a–d** by combination of 3'-azido-nucleosides and 3'-O-propargyl-nucleosides. AZT, 3'-azido-3'-deoxythymidine (**27a**); AddFU, 3'-azido-2',3'-dideoxy-5-fluorouridine (**27b**). (b) Click chemistry synthesis of dimers **34a–d** by combination of 5'-azido-nucleosides and 5'-O-propargyl-nucleosides; 5'-AZT, 5'-azido-5'-deoxythymidine (**31a**); 5'-AddFU, 5'-azido-2',5'-dideoxy-5-fluorouridine (**31b**).

#### 4. Dimers of Known and Synthetic Anticancer Agents

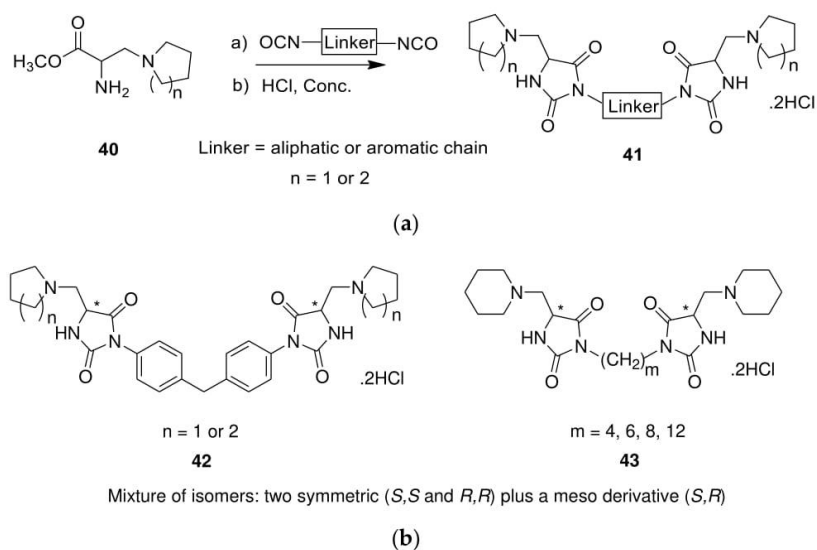
This section analyzes dimers formed with the goal of improving the anticancer effects of the monomeric unit. Simple small molecules such as cantharidin (CAN) and demethylcantharidin (DMC) are protein phosphatase inhibitors that have been used for centuries (since 1264) as anticancer agents against various cancer types [29], and the references cited there (Figure 9). These compounds are effective against multidrug-resistant cells; however, cantharidin is toxic to normal cells, primarily of the gastrointestinal tract, urethra, and kidney. So, many analogues were synthesized to improve its activity while reducing its toxic side effects on normal cells. Cheng et al. reported the synthesis and antiproliferative activity of four unsaturated bis-norcantharimides and the corresponding saturated molecules [29]. The synthesis is easy and consists of an initial Diels–Alder reaction between maleic anhydride (**35**) and furane (**36**) to give **37**, which is reacted with 1,4-diaminobutane, 1,6-diaminohexane, diethylenetriamine, and triethylenetetramine to obtain the final derivatives **38** (n = 2, 4) and **39** (n = 1, 2) (Figure 9). Catalytic hydrogenation provides the corresponding saturated dimeric analogues, but unfortunately, all these

dimers were inactive on human lung cancer cells (A549) when tested by the cell viability MTT assay.



**Figure 9.** Synthesis of four unsaturated bis-norcantharimides: dimers 38 and 39.

Furutachi et al. were interested in the design and biological evaluation of dimeric hydantoin dimers [30], and as seen in Figure 10a, the synthesis is straightforward [31,32]. These authors also reported previous work on symmetrical hydantoin derivatives [33]. In the most recent publication, the synthesis consists of reacting aminoester 40 with a relevant diisocyanide, providing a variety of hydantoin dimers 41 (Figure 10a) [30]. The target molecules are illustrated in Figure 10b. Two types of dimers were fabricated that are linked together either by an aromatic chain 42 or by an aliphatic chain 43 (Figure 10b), and the dimers were obtained as a mixture of stereoisomers. As a first screening, the authors tested the dimers on two types of human cancer cells: U251 (brain glioma cells) and KB3-1 human carcinoma cells [30], and if positive results are obtained, it is planned by the research group to separate the stereoisomers to more precisely study their biological potential.

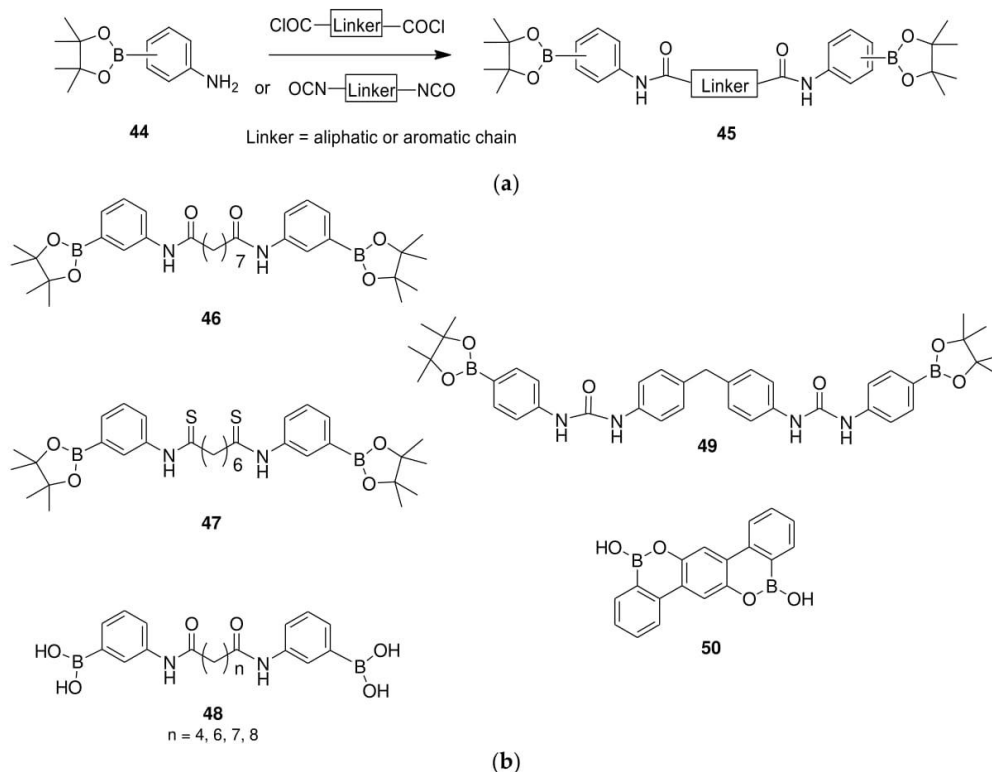


**Figure 10.** (a) General scheme for the synthesis of hydantoin dimers 41. (b) Target dimeric molecules of symmetric hydantoin dimers 42 and 43.



The antiproliferative activity of the dimers was evaluated using the colorimetric MTT assay, which revealed that dimer **42** ( $n = 1$ ) displayed the best activity with an  $IC_{50}$  of 0.46 and 5.21  $\mu\text{M}$  on U251 and KB3-1 cell lines, respectively. This particular  $C_2$ -symmetric dimer is connected by a biphenylmethane bridge. The  $IC_{50}$  of cisplatin, the reference drug, was 3.06 and 6.90  $\mu\text{M}$  against these two cells, respectively. Generally, the hydantoin dimers were more active in U251 cancer cells with an  $IC_{50}$  ranging from 0.46 to 7.0  $\mu\text{M}$  in comparison with an  $IC_{50}$  ranging from 5.21 to 26.08  $\mu\text{M}$  on the KB3-1 cells. Notably, amongst the dimers linked by a methylene chain, dimer **43** ( $m = 8$ ) showed the best antiproliferative activity on brain glioma cells (U251) with an  $IC_{50}$  of 1.05  $\mu\text{M}$ . There was no clear relationship between the length of the aliphatic chain and the observed antiproliferative activities.

A different research project from Furutachi et al. described the synthesis of  $C_2$ -symmetric phenyl boronic acid pinacol esters with different linkers and reported their biological potential as antiviral and antibacterial agents [34], and more recently, as anti-cancer agents [35]. The general structure **45** is illustrated in Figure 11a. These dimers are easily prepared by reacting amino-phenyl boronic acid pinacol esters **44** with relevant dicarboxylic acid dichlorides in the presence of triethylamine (for example, leading to **46**) or with diisocyanide to obtain **49** (Figure 11b). Dimer **47** was synthesized by reacting the precursor bis-amide with Lawesson's catalyst with 55% yield. A unique symmetric compound **50** was obtained with 35% yield from 2,5-diphenylhydroquinone reacted with  $\text{BCl}_3$  and  $\text{AlCl}_3$ . The same research team also described several dimeric pinacol acids [36,37].



**Figure 11.** (a) Preparation of the phenyl boronic acid pinacol esters **45**. (b) Symmetric phenyl boronic acids (**48**,  $n = 4, 6, 7, 8$ ), pinacol esters (**46**, **47**, **49**), and compound **50**.

These molecules were tested for their anti-herpes simplex virus activities [34,36,37]. Interestingly, the phenyl boronic acid pinacol esters **46** showed anti-HSV-1 activity with an  $EC_{50}$  of 8  $\mu\text{M}$ , while the corresponding phenyl boronic acid **48** ( $n = 7$ ) was inactive

( $EC_{50} > 100 \mu\text{M}$ ). The bis-thioamide **47** was twice as active as **46**, with an  $EC_{50}$  of  $4 \mu\text{M}$ ; also dimer **50** with an  $EC_{50}$  of  $5.5 \mu\text{M}$  is an interesting anti-HSV-1 compound.

The new dimers were also tested for their anticancer activities on human brain glioma cells (U251) and human carcinoma cells (KB3-1) using the MTT assay [35]. The symmetric dimer **48** ( $n = 8$ ) was the most active compound, displaying an  $IC_{50}$  of 19 and  $3.78 \mu\text{M}$  on U251 and KB3-1 cancer cells, respectively. Of note, the antiproliferative activity of dimer **48** ( $n = 8$ ) was greater than that of cisplatin ( $IC_{50}$  of  $6.9 \mu\text{M}$ ) on KB3-1 cells. Dimer **49** has a different linker chain and showed activity only on KB3-1 cells with an  $IC_{50}$  of  $44.4 \mu\text{M}$ . Finally, dimer **48** ( $n = 7$ ) showed moderate activity with an  $IC_{50}$  of 39.6 and  $32.5 \mu\text{M}$  on U251 and KB3-1 cancer cells, respectively. There was no clear relationship between the length and nature of the linker with the observed antiproliferative activities. Overall, the synthesis of this type of dimer is easy and some of the compounds present interesting activity that could guide future development.

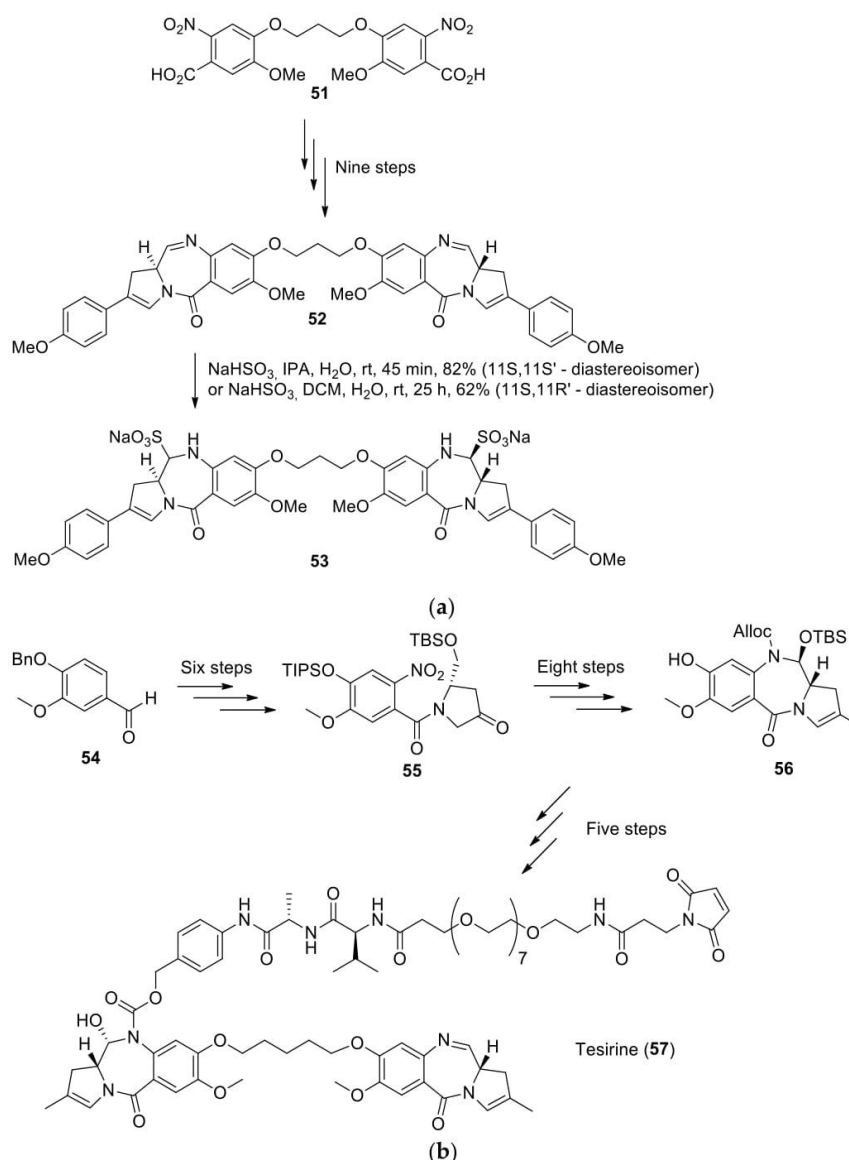
The antitumor properties of pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine (PBD) compounds have been studied since 1963, when they were first isolated from the fermentation broth of the thermophilic actinomycete *Streptomyces refuineus* [38]. An initial biological screening of the extract showed a specific activity against Gram-positive organisms and an antitumor activity against sarcoma 180 and adenocarcinoma 755 mouse tumor systems [38]. It was later understood that the molecular structure of PBD compounds allows them to fit in DNA minor grooves and the electrophilic carbon of the imine group reacts with the amine of guanine bases, revealing the alkylating properties of PBDs [39]. In order to enhance their cross-linking properties, synthetic PBD dimers linked by their phenolic C8-positions via flexible ether bridge were investigated, since molecular modeling and NMR studies showed that this type of linkage could allow both PBD units to perform intrastrand or interstrand DNA cross-links, a hypothesis that was later reinforced by DNA-binding studies [39]. To that end, Howard et al. synthesized interesting PBD dimers in a nine-step synthesis (Figure 12a) by starting from the known 2-nitrobenzoic acid dimeric core (**51**) [40]. The key steps of this synthesis are the tetralactam formation, which was achieved with Raney nickel and hydrazine followed by a Suzuki coupling reaction. The resulting dimer SG2202 (**52**) was then tested in vitro, where it exhibited significantly higher cytotoxicity than other known PBD dimers [40]; however, the lack of hydrosolubility of SG2202 limited the in vivo assay. In order to resolve this problem, the prodrug SG2285 (**53**) was also synthesized by adding a bisulfite moiety at the C11 and C11' positions. Both of these dimers were then tested on ten human tumor cell lines via an Alamar Blue assay. Although the prodrug SG2285 was slightly less effective than SG2202, both dimers showed a cytotoxic activity in the picomolar range for all cell lines tested, the best results being observed for the T lymphoblast cell lines CCRF-CEM, with an  $IC_{50}$  of 0.1 pM for SG2202 and 1.4 pM for SG2285 [40]. Further studies also demonstrated the cross-linking activity of SG2202 and SG2285 [41].

The biological potential of SG2285 (**53**) has sparked the attention of the scientific community in the last few years and its intellectual property has been acquired by Spirogen Ltd., London, UK. Following the outstanding results of SG2285, Spirogen developed other PBD dimers such as SG3249, also named Tesirine (**57**), a dimer first synthesized in 2012 [42] (Figure 12b).

Tesirine was designed to act as a warhead in the domain of antibody-drug conjugates (ADCs). In Tesirine, the PBD dimer acts as an antitumoral agent, whereas a valine-alanine linker is designed to be cleaved by Cathepsin B in order to release the chemotherapeutic drug in the body. Tesirine also has a polyethylene glycol (PEG) spacer and a maleimide designed to allow the conjugation of various antibodies via a Michael addition.

In 2016, Tiberghien et al. developed a scale-up synthetic route to Tesirine (Figure 12b) [43]. Key steps in their synthesis involve the nitration of benzylvanillin (**54**), followed by a Pinnick oxidation in order to form the carboxylic acid that can react with the hydroxyproline derivative to yield the corresponding amide. The hydroxyl group on the molecule is then oxidized with a TEMPO/TCCA combination, which results in the molecule **56**. Afterward,

this compound is treated with triflic anhydride followed by a Suzuki coupling reaction to induce the methyl group at the C2 position. The nitro group was then reduced with zinc and dilute formic acid before being treated with allyl chloroformate to yield the corresponding carbamate (allyloxycarbonyl or alloc group). A deprotection of the hydroxyl group on the 2-pyrroline ring and a ring-closing Swern oxidation allowed the formation of the lactam, which was modified to form molecule 57. This molecule was then subjected to Williamson ether chemistry via 1,5-diiodopentane in order to produce the PBD dimer. Prior to dimerization, one unit was linked with alloc-Val-Ala-*para*-amino-benzylalcohol. After the dimerization, the nitrogen bearing the alloc group was deprotected and the free amine was coupled with Mal-dPEG<sub>8</sub>-Acid to form Tesirine (57). With over 30 steps in total, it was possible for the authors to achieve this synthesis with a total yield of 0.54% [43].

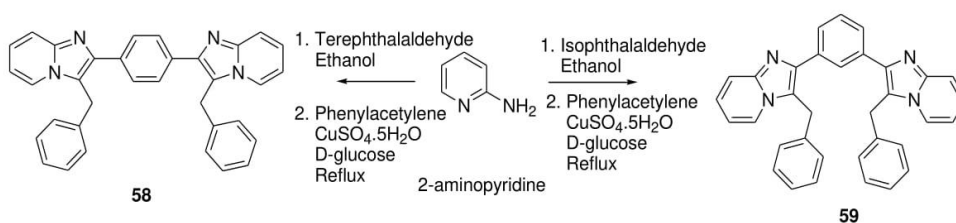


**Figure 12.** (a) SG2202 (52) and its prodrug SG2285 (53), two synthetic pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine (PBD) dimers synthesized from the 2-nitrobenzoic acid dimer (51). (b) Scale-up synthesis of Tesirine (57) starting from benzylvanillin (54).



The activity of Tesirine was studied and it was found that it exhibits cytotoxic effects in the ng/mL range against HER2 expressive human breast cancer cell line SKBR3 [43]. After more intensive biological studies [44], linkage of Tesirine with antibodies was tested and the antibody rovalpituzumab was chosen for its ability to bind to Delta-like ligand 3 (DLL3), an inhibitory Notch ligand expressed on the cellular surface of small-cell lung cancer and large-cell neuroendocrine tumors but expressed minimally in healthy tissues [45]. The drug candidate Rovalpituzumab Tesirine (Rova-T) was tested on small-cell lung cancer and demonstrated excellent cytotoxic activity [45]. Rova-T even progressed to clinical trials, but the developer AbbVie announced in 2019 that the Rova-T research and development program was ended in phase III clinical study due to a lack of survival benefit for the patients [46].

Compounds containing Schiff base are known to often exhibit biological activity [47], and some drugs containing an imidazole motif that possess anticancer [48], hypnotic [49], and anxiolytic [50] properties are currently marketed. A series of Schiff-base dimers was developed in order to study the impact of dimerization on the biological activity of such compounds [51]. In this study, 30 dimers were synthesized and their effect was studied in three types of cancer cell lines. Of all the novel compounds, the dimers **58** (Figure 13) and **59** showed the best cytotoxic activity. These two compounds bear an imidazo[1,2-*a*]pyridine skeleton and were fabricated by a one-pot synthesis, where 2-aminopyridine reacts first with the corresponding dialdehyde to form the amidine, which is then heated in the presence of phenylacetylene, CuSO<sub>4</sub>, and D-glucose to yield the desirable compound [52].



**Figure 13.** Reaction scheme of the transformation of 2-aminopyridine into the symmetric imidazo[1,2-*a*]pyridine dimers **58** and **59**.

Although many of the dimers appear to exhibit no significant cytotoxicity, compounds **58** and **59** showed high activity against the three cell lines tested: cervical (HeLa), breast (MDA-MB-231), and renal cancer cell lines (ACHN). In all cases, these dimers were found to possess an IC<sub>50</sub> below 1 μM. In vivo studies were conducted with compounds **58** and **59** on mammary carcinoma rats and the parameters evaluated were hemoglobin, packed cell volume, red blood cells, standard deviation, and white blood cells. The results showed that these two compounds had similar activity to the tamoxifen reference, which highlights the therapeutic potential of symmetric imidazo[1,2-*a*]pyridine dimers.

### 5. Polyphenol Dimers

It is now established that flavonoids provide several health benefits, including anti-oxidative, anti-inflammatory, anti-mutagenic, and anti-carcinogenic properties, along with being able to modulate certain enzyme functions [53]. Silybin is a flavonolignan product extracted from the milk thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn. (Asteraceae)), also named silymarin [54]. It is isolated as a mixture of two diastereoisomers silybin A (**60a**) and silybin B (**60b**) (Figure 14a), and they possess antioxidant and hepatoprotective activities. Interestingly, 2,3-dehydrosilybin **61** displays higher antioxidant and anticancer activities than silybin [55,56]. Generally, dimerization of these products (**60a**, **60b**) produces compounds with higher biological potential [54].



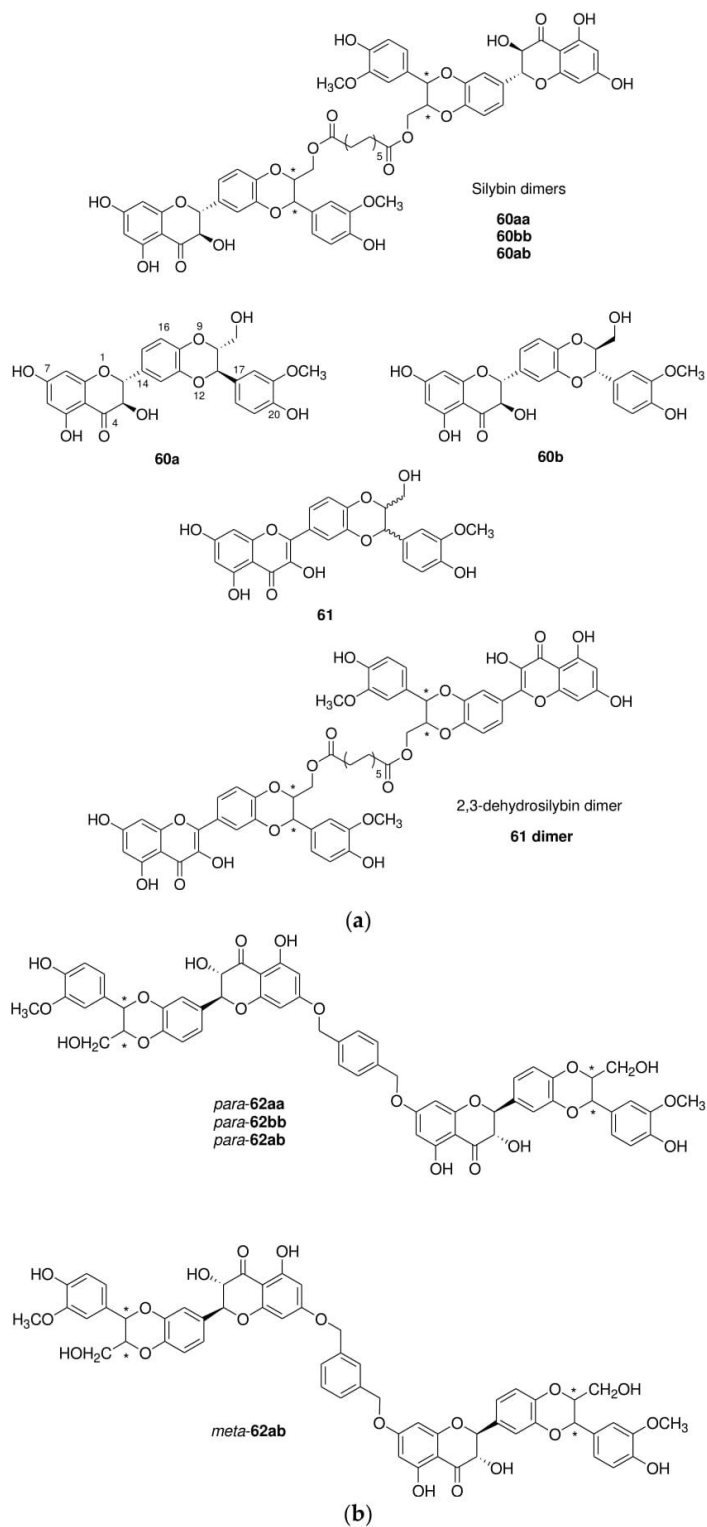


Figure 14. Cont.

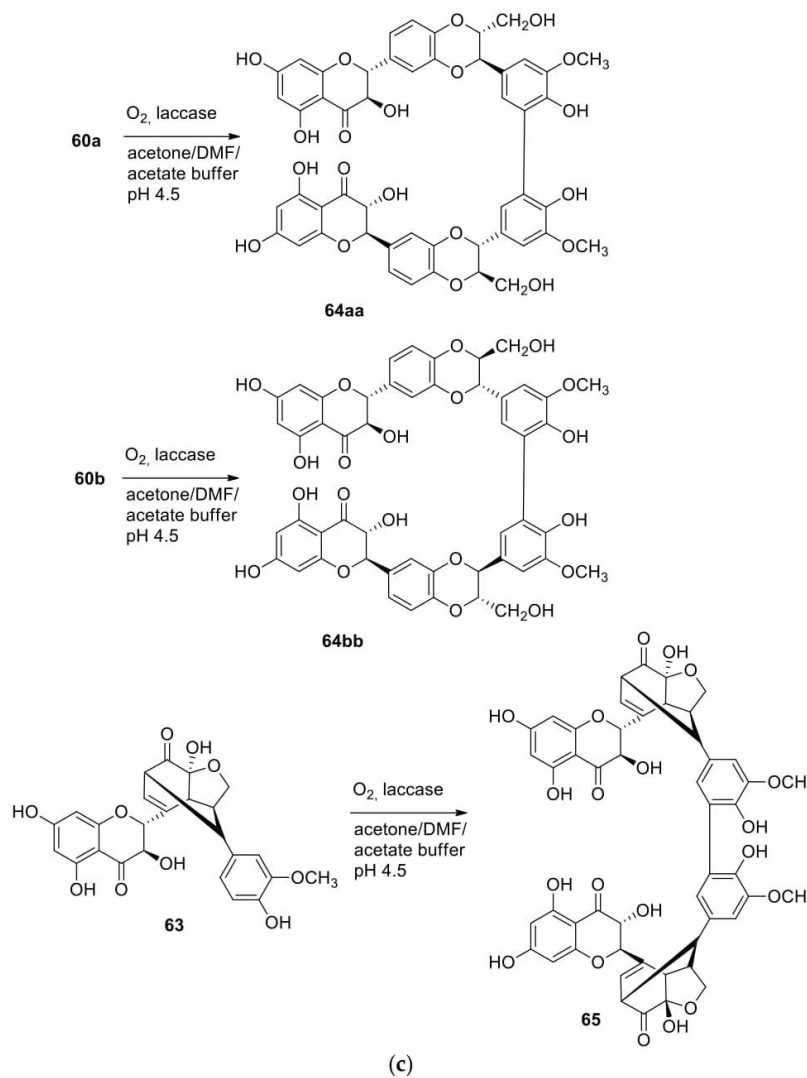
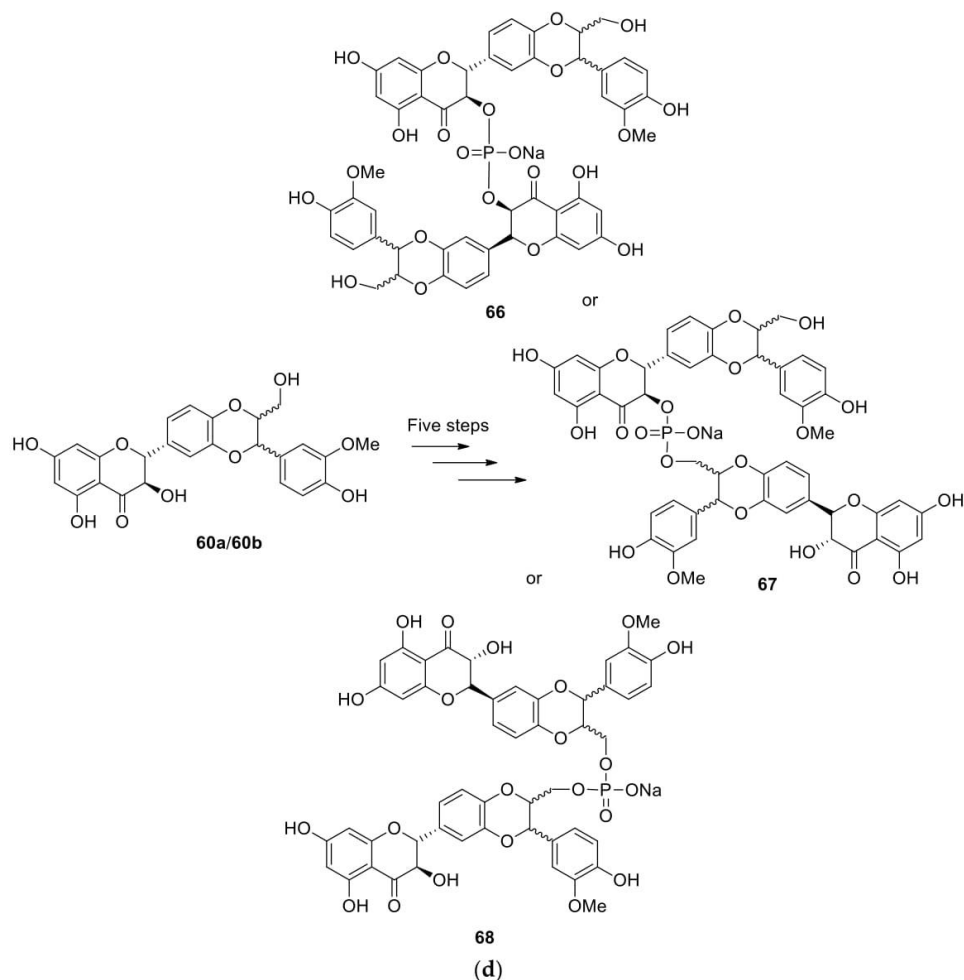


Figure 14. Cont.



**Figure 14.** (a) Structure of silybin **60a** and **60b**, of 2,3-dehydrosilybin **61** and their dimers. (b) Silybin A and B dimers (**62**) with different combination linked at C-7 by a diether spacers. (c) Synthesis of symmetric flavonolignan dimers **64aa**, **64bb**, and **65** via oxidative coupling involving laccase from *Trametes versicolor*. (d) Synthesis of phosphate-linked silybin dimers **66–68** synthesized from silybin A/B **60a/60b**.

The  $C_2$ -symmetric dimers **60aa** and **60bb** were prepared using a transesterification reaction with Novozym 435 and the divinyl ester of dodecanedioic acid in the presence of silybin **60a** or **60b** with 24% and 44% yields, respectively (Figure 14a). The novel dimers are linked at C-23 via a diester spacer and they are assembled by a lipase-mediated method [57]. Shorter divinyl ester did not provide any dimers but only monomeric esters. The asymmetric dimer was obtained in a stepwise manner via the monoester product of **60a**, which was then combined with **60b** to produce **60ab** in a 26% yield.

Another series of flavonolignan dimers was also developed that were linked by diether linkers either using 1,3-bis(bromomethyl)benzene or 1,4-bis(bromomethyl)benzene (Figure 14b). So, upon treatment of silybin A (**60a**) or silybin B (**60b**) with the relevant bis(bromomethyl)benzene and potassium carbonate in acetone at reflux, the dimers *para*-**62aa**, *para*-**62bb**, *para*-**62ab**, and *meta*-**62ab** were obtained as a diether linked at position C-7 (Figure 14b).

In order to evaluate antioxidant ability of the dimers, a 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay was performed. The radical scavenging ability of the silybin dimers **60aa**,

**60bb**, and **60ab**, and *para*-**62aa**, *para*-**62bb**, *para*-**62ab**, and *meta*-**62ab** (inhibition values varying between 7.1% and 10.7%) was superior to the inhibition value measured for silybin A (**60a**) (6.6%). However, the value determined for 2,3-dehydrosilybin **61** (83%) was much higher than the inhibition value of its corresponding dimer (see **61** dimer) (33.4%). The same trend in the results was observed in an inhibition of microsomal lipoperoxidation assay. The cytotoxic potential of silybin A **60a** and its dimer **60aa**, and 2,3-dehydrosilybin **61** and its dimer (**61** dimer) was tested on HUVEC vascular cells, NAK skin cells, BALB/c 3T3 fibroblasts, and HepG2 transformed hepatoma epithelial cells. Although all compounds were ineffective on the NAK cell line, silybin A (**60a**) was found to be less active than its dimer **60aa** on every other cell, and 2,3-dehydrosilybin **61** was more active than its dimer (**61** dimer). The authors rationalized the finding that dimerization of 2,3-dehydrosilybin **61** reduces its biological potential, whereas it enhances the potential of silybin A (**60a**), by the planarity of the flavonoid moiety of the 2,3-dehydrosilybin (**61**), which is much greater than that of silybin A. This planarity favors  $\pi$ -electron delocalization, leading to  $\pi$ -stacking within the dimeric molecule. Hence, the two flavonoid cores of the 2,3-dehydrosilybin dimer (**61** dimer) are much more prone to stacking than the monomeric units of dimer **60aa**, which can block some hydroxyl groups that are key components in the reactivity and antioxidant activity of these compounds, such as the resonance stabilization they can induce. Nonetheless, more assays are needed to grasp the importance of the stereochemistry of these flavonolignans dimers on their biological activity.

In another study, Gavezzotti et al. proceeded to dimerize the flavonolignans silybin A (**60a**), silybin B (**60b**), and silydianin (**63**) [58–60] at position C-21. In each case, the key step of the dimerization (Figure 14c) involves an enzymatic oxidative coupling using laccase from *Trametes versicolor*. The DPPH scavenging activity of the three dimers **64aa**, **64bb**, and **65** was tested, along with their corresponding precursors [60]. All the dimers show a better DPPH scavenging activity than their precursors, the most active compound being the dimer **65** with an  $IC_{50}$  of  $7.92 \pm 0.05 \mu\text{M}$ , a significant improvement compared with the substrate **63**, which showed an activity of  $27.4 \pm 0.7 \mu\text{M}$ . However, none of the activities of the compounds tested in this study surpassed the DPPH scavenging activity of the known antioxidant Trolox, which displays an  $IC_{50}$  of  $4.18 \pm 0.1 \mu\text{M}$  [61].

In order to enhance the solubility of silybin while retaining the properties of flavonolignans dimers, a series of three silybin dimers with phosphate linkers was developed [62]. The dimers were fabricated independently using a five-step reaction sequence involving phosphoramidite chemistry (Figure 14d) [63]. Three dimers, **66**, **67**, and **68**, were tested for antioxidant activity by DPPH tests. Every dimer was more active than the silybin **60a/60b** ( $IC_{50}$  of  $1.40 \pm 0.06 \text{ mM}$ ), the best one being dimer **68** with an  $IC_{50}$  of  $0.34 \pm 0.07 \text{ mM}$ . However, all of the silybin derivatives were less active than the reference drug quercetin ( $IC_{50}$  of  $0.18 \pm 0.01 \text{ mM}$ ). Furthermore, the novel compounds were found to be non-cytotoxic against HepG2 cells and the solubility of the dimers was found to be around 20 mg/L at circumneutral pH values, which is a considerable improvement compared with silybin **60a/60b** that possesses a solubility around 0.4 mg/L. These results prove that polyphenol dimers are promising compounds in the field of synthetic antioxidants.

Curcumin (**69**) has been proven to be one of the best antioxidants discovered in nature [64] but is known to decompose under physiological conditions [65]. Its degradation products mainly consist of vanillin (**70a**), dehydrozingerone (**70b**), and ferulic acid (**73**) (Figure 15) [65]. Following this discovery, a new research avenue was undertaken that involves the modification of these degradation products to create new antioxidants stable under physiological conditions [66]. These compounds are shown in Figure 15. Note that the dehydrozingerone dimer **74** was fabricated from dehydrodivanillin that was treated with an aqueous solution of LiOH in acetone [66], and that ferulic acid (**73**) and its dimer **77** were extracted from saponified maize bran and grass samples [67,68].

The curcumin derivatives were evaluated for their antioxidant properties [68]. The kinetic study of the autoxidation of triacylglycerols of sunflower oil showed that curcumin (**69**) and the  $C_2$ -symmetric dimers **74** and **75** displayed stronger antioxidant efficiency and

inhibition degrees than the other compounds and were more active than their corresponding monomers. However, an oxygen radical absorbance capacity assay with fluorescein was also performed, and with this model, dimers and monomers presented similar activity. Nonetheless, the monomers and dimers (74–77) showed superior activity to the reference Trolox at a similar concentration (0.63  $\mu\text{M}$ ). This assay was performed in water, which can greatly impact the results, since hydrogen bonding may affect the radical scavenging potential of the molecules. Structure–activity studies showed that the presence of an  $\alpha,\beta$ -unsaturated chain seems to be a key component in the chain-breaking antioxidant activity of the compounds, since this moiety can scavenge the generated radicals. This effect also seems to be stronger when the  $\alpha,\beta$ -unsaturated chain is located in *para*-position to a hydroxyl group on an aromatic ring. The authors concluded that since curcumin (69) and the compound 74 are two dimers originating from the monomer 70b, the type of linkage that unites both phenolic units of these dimers does not change the reactivity or antioxidant efficiency of this type of molecule.

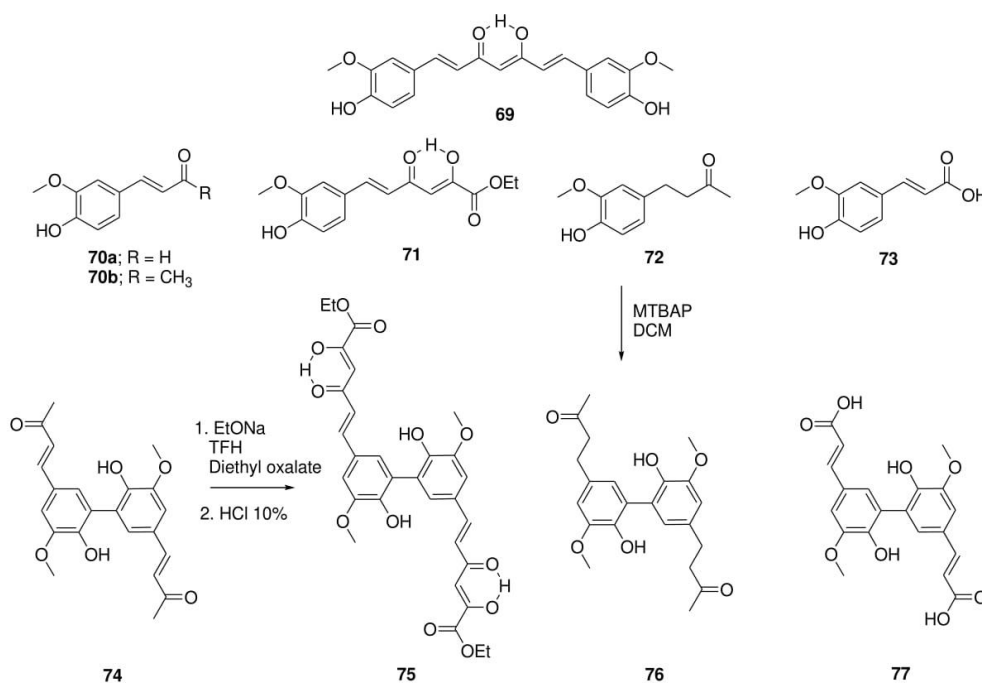


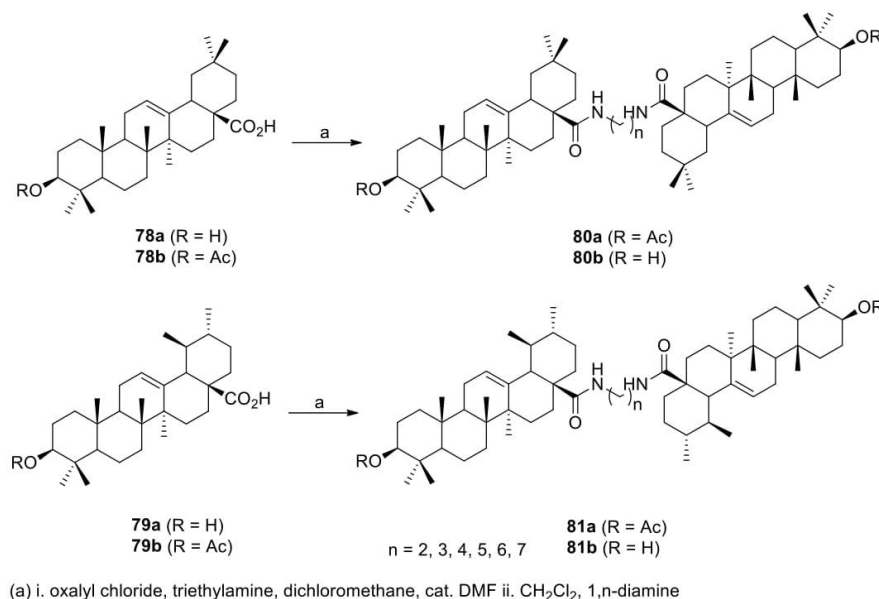
Figure 15. Representation of curcumin (69) and related compounds 70–77.

## 6. Terpenoid Dimers

Terpenoids are an important class of natural products with diverse biological properties (e.g., anti-inflammatory, antioxidant, and anticancer) and are often used in traditional herbal medicine. Several dimers of ursolic and oleanolic acid (78a and 79a) were recently reported by Hoenke et al. [69]. They were formed with the goal of improving their anticancer potential. The symmetric dimers were linked by an  $\alpha,\omega$ -diaminoalkyl chain of various lengths leading to derivatives 80b and 81b (Figure 16). The acids were initially acetylated (78b and 79b, R = Ac), linked with relevant diamine chain to produce 80a and 81a (R = Ac) and hydrolyzed to the final dimers 80b and 81b (R = H). Despite acetylated ursolic and oleanolic acid as well as some carboxamides showing better cytotoxic activity than the parent acids [70–72], none of the dimers were active when tested on human cancer cell lines (A375, HT29, SW1736, MCF-77, A2780, FaDu, and A549) and nonmalignant mouse



fibroblasts (NIH 3T3). The authors are now investigating skin penetration, stability, and bioavailability of the dimers to be used as slow-release system for transdermal applications.

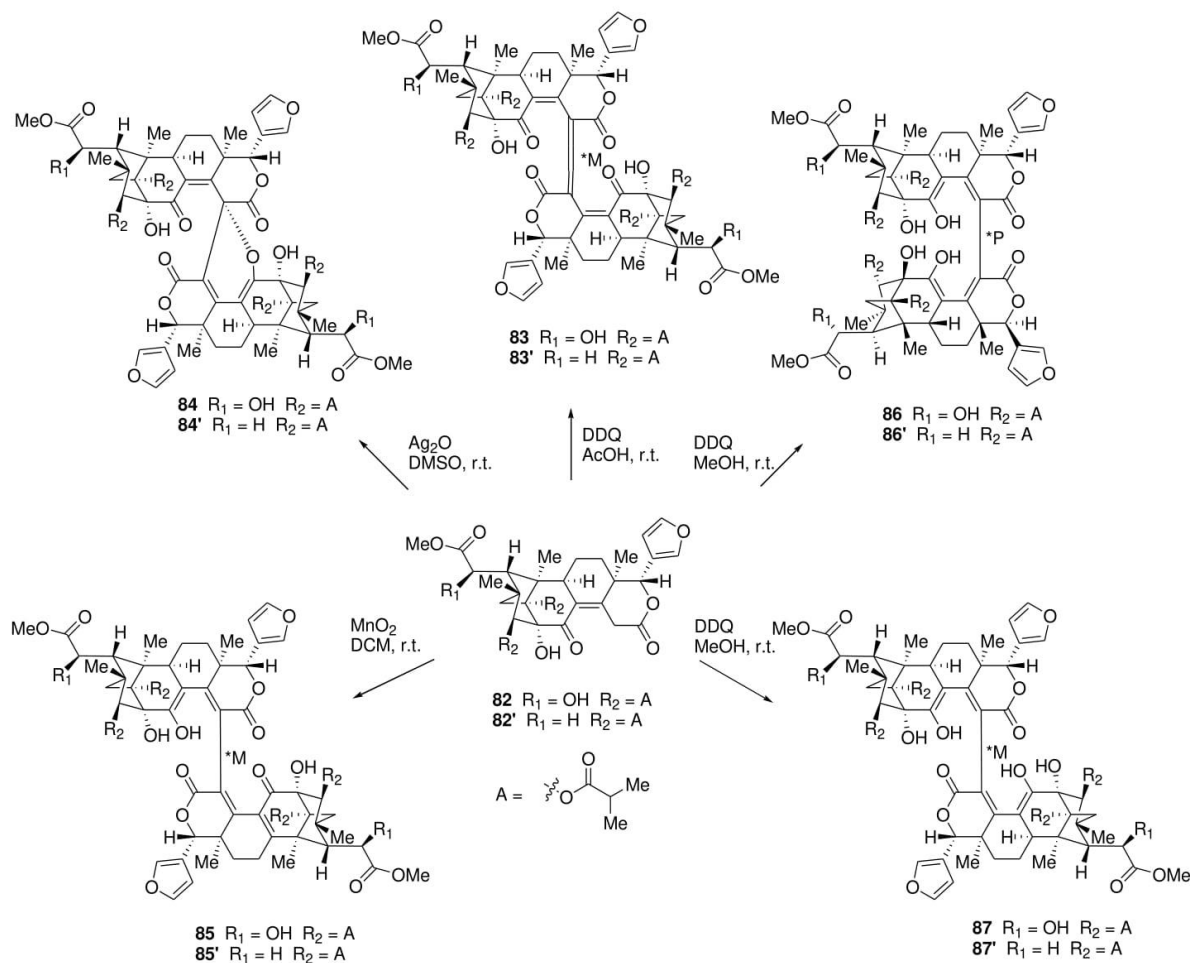


**Figure 16.** Ursolic acid (78a), oleanolic acid (79a), and dimers 80b and 81b.

Limonoids are categorized as highly oxidized tetranortriterpenoids, which mainly come from the plant families *Meliaceae*, *Rutaceae*, and *Cneoraceae* [73]. These compounds are also well-known for their important biological activity [74]. In 2017, Li et al. reported the discovery of the first limonoid dimer, named krishnadimer A (87') (Figure 17), a C<sub>2</sub>-symmetric dimer linked by an axially chiral C15–C15' central bond possessing an M-configuration. This compound was isolated from the mangrove *Xylocarpus moluccensis* [75]. Following this discovery, Li et al. synthesized a series of limonoid dimers, analogues of krishnadimer A (87') [76]. Starting from moluccensin A (82') [77] and 6R-hydroxymoluccensin A (82), the dimers 83, 83', 84, 84', 85, 85', 86, 86', and 87 were formed via oxidative carbon–carbon radical coupling. Krishnadimer A (87') was also synthesized in order to obtain a sufficient quantity for biological assays.

Of all the dimers studied, only the compounds 83, 83', 87, and 87' possess C<sub>2</sub>-symmetry. Every molecule was tested for cytotoxic activity against several human breast cancer cell lines. Compounds 84, 84', 85, 85', 86, and 87 were found to be inactive on all cell lines and compounds 83 and 83' were poorly soluble in DMSO and therefore could not be tested. Compound 82' and 86' were tested during a previous study and they showed no cytotoxic activity against eight human tumor cell lines [75]. Derivative 87' was further tested on seven human breast cancer cell lines (MDA-MB-231, MDA-MB-453, MCF-7, MCF-7/ADR, MT-1, SK-BR-3, and ZR-75-1) [76]. Although it showed no activity on the last four cell lines, it displayed weak cytotoxic activity against MCF-7 cells (with an IC<sub>50</sub> of 34.05 ± 7.35 μM) and showed potent activity against MDA-MB-231 (IC<sub>50</sub> of 5.57 ± 1.48 μM) and MDA-MB-453 cells (IC<sub>50</sub> of 3.93 ± 0.75 μM), slightly exceeding the activity of cisplatin for this cell line (IC<sub>50</sub> of 4.37 ± 0.32). The mechanism of action of 87' was studied and it was discovered that this dimer induces cell-cycle arrest at G2/M phase and apoptosis. Moreover, an accumulation of reactive oxygen species (ROS) in MDA-MB-231 and MDA-MB-453 cell was measured. In vivo studies involving the transplantation of MDA-MB-453 cells into nude mice were conducted and 87' successfully inhibited the growth of MDA-MB-453 tumors by 21.17% and 61.83% at doses of 10 and 30 mg/kg, respectively. It appears that

$C_2$  symmetry and the stable M-configuration of the C15–C15' central axis are of utmost importance for the medicinal activity of 87'.

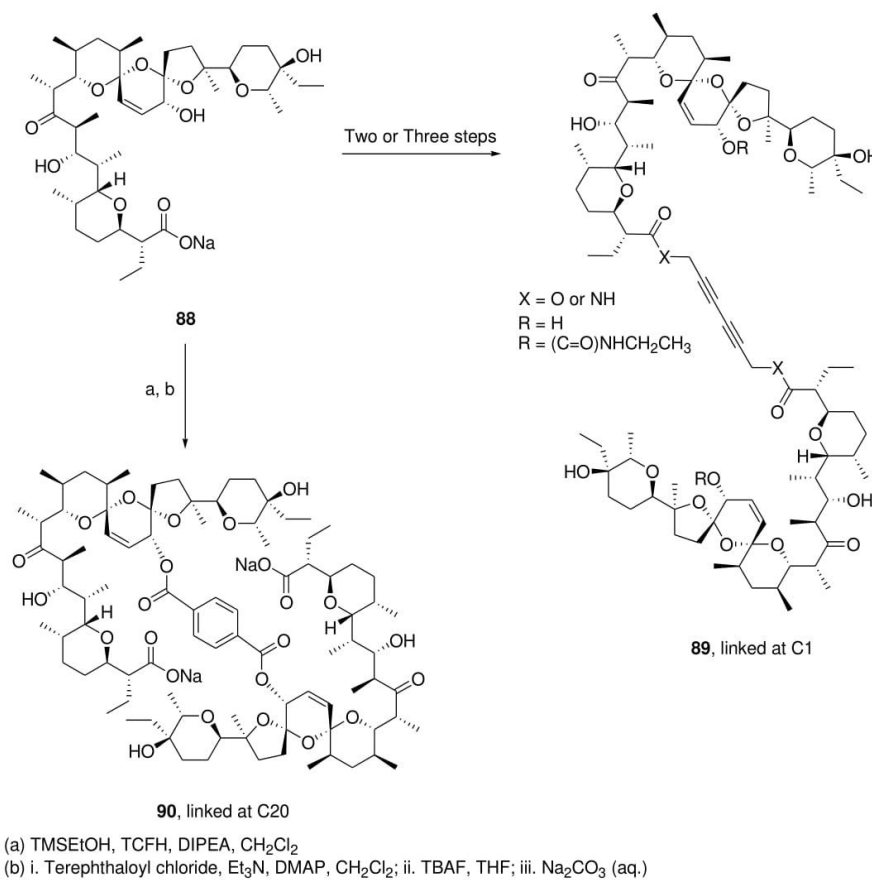


**Figure 17.** Formation of the limonoid dimers 83, 83', 84, 84', 85, 85', 86, 86', 87, and 87' along with their corresponding starting compounds 6*R*-hydroxymoluccensin A (82) and moluccensin A (82').

### 7. Dimers of Known and Synthetic Antibacterial Agents

Salinomycin (88) is a polyether ionophore with a wide range of biological activities, primarily used in veterinary medicine as a coccidiostatic agent and growth promoter [78]. It was discovered that this natural product shows selective targeting of breast cancer stem cells [79] and anticancer potential against several human cancer cell lines [80]. These reports caught the interest of researchers and numerous semi-synthetic analogues were fabricated with the goal of obtaining compounds with better biological activity. Amongst this work, an early report of salinomycin dimers, linked by a triazole linker, displayed higher cytotoxicity against breast cancer cells than the corresponding monomer [81]. Hence, Antoszczak et al. prepared two different types of  $C_2$ -symmetric salinomycin dimers by a rather expeditious and efficient method [82]. Four different salinomycin dimers were formed using a copper(I)-catalyzed Glaser-type reaction (general structure 89) (Figure 18). These dimers were fabricated via the propargyl ester or amide of salinomycin with 83% and 88% yield, respectively, before the dimerization step using copper (I) chloride (CuCl). The

C20 alcohol was either left intact or was protected as a carbamate using ethyl isocyanate as the reagent leading to two additional dimers. The C20-O-terephthalate dimer **90** was produced by a three-step reaction sequence with 36% overall yield. Of note, the Glaser reaction was achieved simultaneously in the presence of ethyl isocyanate used for the carbamylation reaction.



**Figure 18.** Synthesis of C<sub>2</sub>-symmetric salinomycin dimers **89** linked at C-1 and **90** linked at C-20 by a diyne chain and a terephthalate ester, respectively.

The anti-proliferative activity of the dimers was evaluated using the SRB assay on human colon carcinoma (LoVo, doxorubicin-sensitive LoVo/DX, and doxorubicin-resistant) on three breast cancer cell lines (JIMT-1, MCF-7, and SKBR-3) and on the normal-like breast epithelial cell line (MCF-10A). Unfortunately, the four dimers (see **89**) were essentially inactive. However, dimer **90** displayed activity similar to that of salinomycin (**88**) and was more active than cisplatin. To illustrate its activity, the IC<sub>50</sub> reported for MCF-7 breast cancer cells are: salinomycin, 1.5 μM; **90**, 1.8 μM; cisplatin, 7.7 μM; and doxorubicin, 0.26 μM. Interestingly, the dimer **90**, with an IC<sub>50</sub> of 21 μM, was much less toxic than doxorubicin with an IC<sub>50</sub> of 0.58 μM on normal-like breast epithelial cell line MCF-10A. Furthermore, **90** displays an IC<sub>50</sub> of 2.8 μM in comparison with 10 μM for doxorubicin on LoVo/DX.

In the aim of enhancing the antibacterial properties of hydantoin type drugs [83], Furutachi et al. synthesized a series of seven hydantoin derivatives (**42**, **95–100**), with three of these compounds possessing a C<sub>2</sub>-symmetry axis (**42**, **95**, **96**) [84] (Figure 19). The compounds were all produced by the reaction of a β-aminoalanine derivative **91** with



various aryl isocyanates **92** leading to general structures **93** and **94** (Figure 19) [31]. The new compounds were tested on a Gram-positive (*S. aureus*) and a Gram-negative (*E. coli*) strain for antibacterial activity. Of all these compounds, the three most potent candidates are the C<sub>2</sub>-symmetric dimers (**42**, **95**, and **96**), the best one being compound **42**, which exhibited a minimum inhibitory concentration of 24 nM against *S. aureus* and 95 nM against *E. coli*. Furthermore, every compound tested was more active against the Gram-positive strain *S. aureus* than the Gram-negative *E. coli*, for reasons that remain to be elucidated.

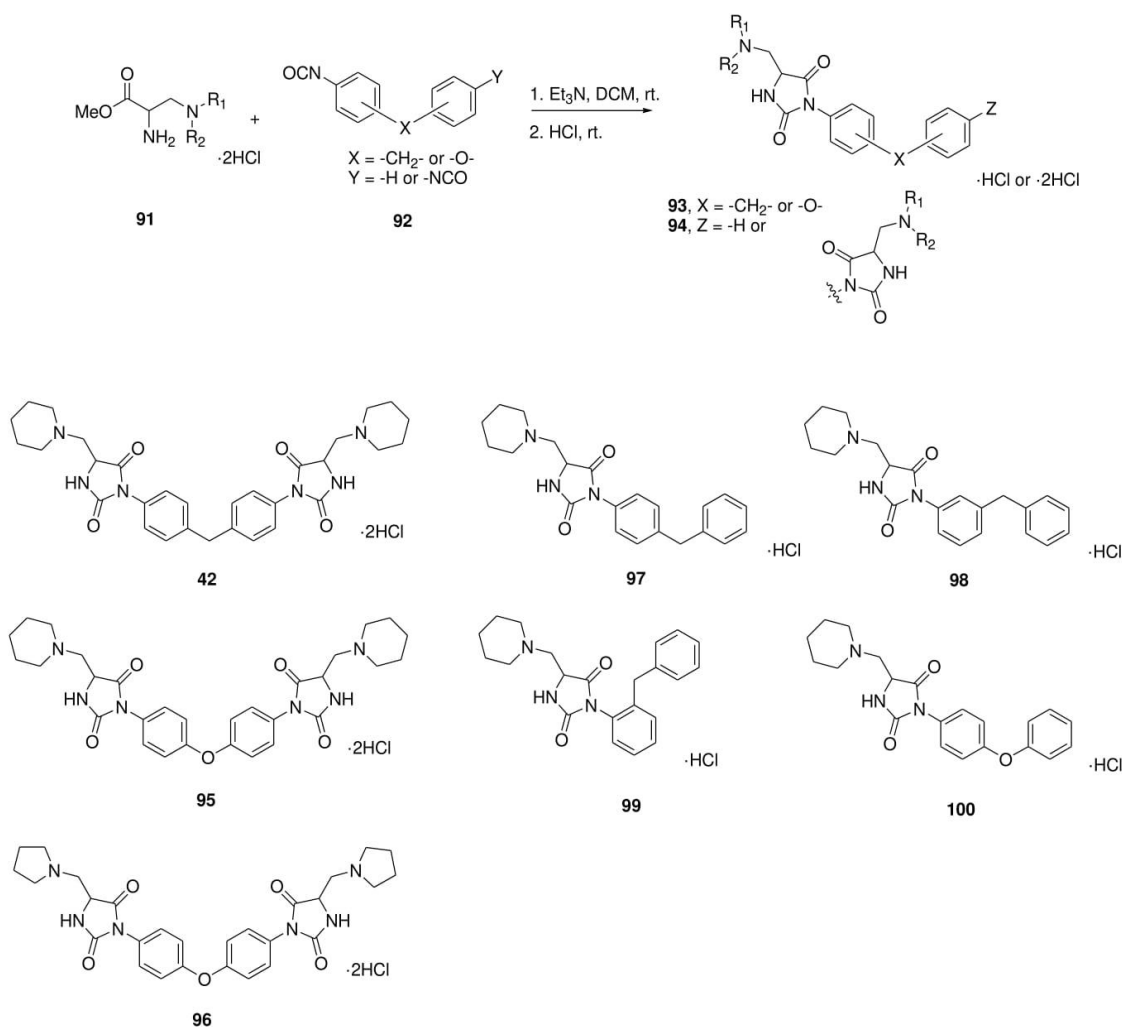
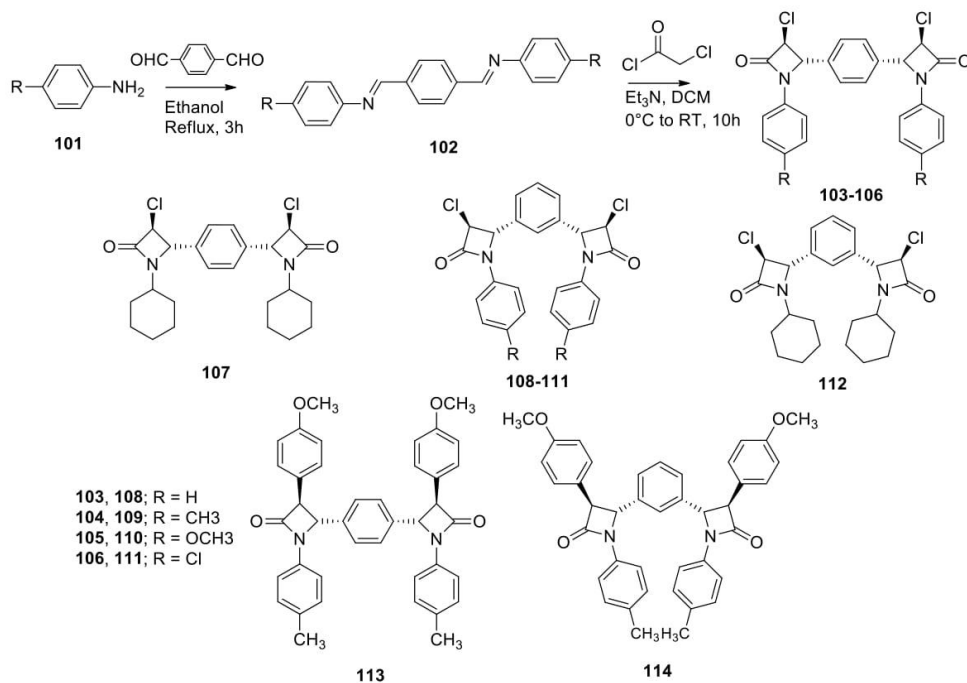


Figure 19. Reaction scheme of the synthesis of the hydantoin motif and representation of the various hydantoin derivatives.

Compounds containing the  $\beta$ -lactam ring, such as penicillin or cephalosporin, are known to possess antibacterial activity due to their capacity to inhibit the synthesis of bacterial cell walls [85]. More recently, these compounds were also proven to possess certain antitumor activity [86]. A series of symmetric  $\beta$ -lactam dimers were produced by reaction of an aromatic dialdehyde with various amines **101** to yield a series of Schiff bases **102** (Figure 20) [87]. These imines were then treated with chloroacetyl chloride, or the corresponding acyl chloride, in order to form compounds **103** to **114**, illustrated in Figure 20. Those novel molecules were exposed to nine different bacterial strains to

examine their antibacterial activities. The results varied from low to medium, the most active dimer being molecule **109**, which notably showed an inhibition zone of 26 mm for the strains *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhi*, and *Staphylococcus aureus*. However, some intermediate compounds involved in the formation of dimers **113** and **114** were more active than the dimers, and none of the novel compounds were more active than the reference drugs amoxicillin and ceftriaxone, which had an inhibition zone of 30 mm in every tested strain. Tested for their in vitro anticancer activity, the compounds showed variable results. The best results was obtained with dimer **104** with  $IC_{50}$  values of 0.41, 0.42, and 0.45  $\mu$ M against cervical HeLa, breast MDA-MB-231, and renal ACHN cell lines, respectively. These results are even higher than that obtained for doxorubicin, which highlights the biological potential of  $\beta$ -lactam dimers in the discovery of new anticancer drugs.

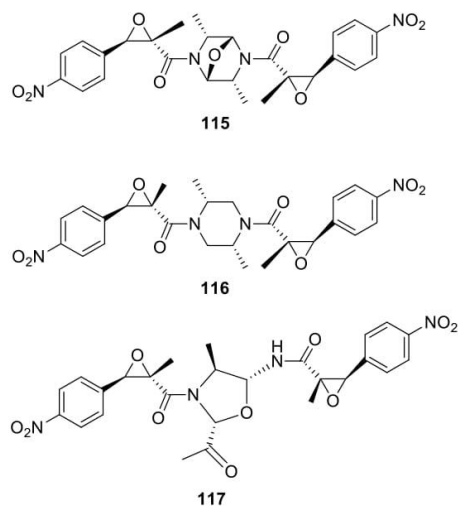


**Figure 20.** General scheme of the synthesis of  $C_2$ -symmetric  $\beta$ -lactam dimers and representation of novel compounds **103** to **114**.

## 8. Recently Isolated Dimeric Natural Products

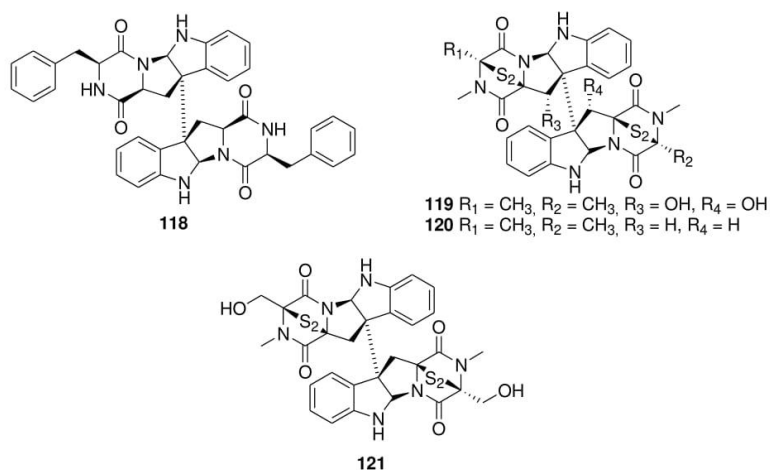
Three natural products possessing two *trans*-epoxyamide were isolated from the deep-sea fungus *penicillium chrysogenum* (**115–117**) [88]. The structures of the compounds were characterized by IR,  $^1H$ -, and  $^{13}C$ -NMR spectroscopy and by mass spectrometry. X-ray diffraction analysis of compounds **115** and **116** was performed, confirming the spectral analysis. Interestingly, two of the dimers (**115** and **116**) feature a center of symmetry (Figure 21).

The compounds were tested for their anticancer activity against K562, A549, and HUH7 cancer cell lines and were inactive at 30  $\mu$ M. They were also tested for their antibacterial activity against three bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Salmonella* sp.) and were inactive. Interestingly, compound **117** showed anti-inflammatory activity, inhibiting the production of pro-inflammatory cytokine IL-17, with an inhibitory rate of 40% at 1  $\mu$ M. Compounds **115** and **116** did not display any inhibitory effects at 50  $\mu$ M.



**Figure 21.** Natural products with two nitrophenyl *trans*-epoxyamides, chrysamides A–C (115–117) isolated from the deep-sea fungus *Penicillium chrysogenum*.

Although the medicinal properties of diketopiperazine produced by marine microorganisms have been extensively studied in the past few years [89,90], the biological and biochemical interest in diketopiperazine dimers (Figure 22) produced by those same microorganisms is lacking. One of such compounds is WIN 64821 (118), a molecule that can be extracted from *Aspergillus sp.* [91]. Even though WIN 64821 presents a certain cytotoxic activity on 37 human cancer cell lines [92], the biological interest in this molecule is because it exhibits the capacity to compete with Substance P (SP) to act as an antagonist of NK-1 receptor with an  $IC_{50}$  of 0.24  $\mu$ M [93]. Derivatives of WIN 64821 were also synthesized by Barrow et al. before being tested for binding activity with the NK-1 receptor, and none of them showed affinity for the receptor nearly as potent as WIN 64821, which shows that the symmetry of this molecule is a key component in its biological activity [93].



**Figure 22.** Representation of biologically active diketopiperazine dimers produced by marine microorganisms.

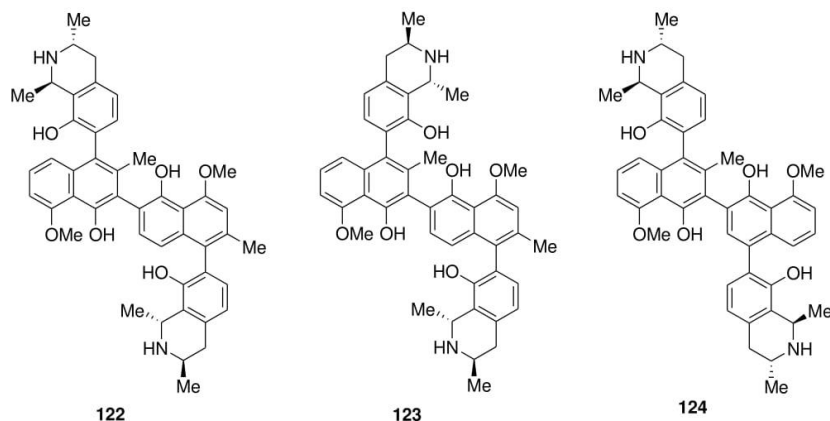
Another pair of interesting dimers are Verticillin A (119) and 11,11'-dideoxyverticillin A (120). Both of these compounds are found in *Penicillium sp.*, a marine-derived fun-



gus [94]. Both of these dimers exhibit a diketopiperazine moiety along with an interesting disulfide bridge inside the piperazine skeleton. Although both of these dimers share a similar structure, they do not possess the same biological activity. Verticillin A (**119**) demonstrates an interesting anticancer activity against pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) and colon carcinoma due to its ability to inhibit the following histone methyltransferases (HMTases): SUV39H1, SUV39H2, G9a, GLP, NSD2, and MLL1 [95,96]. Furthermore, in vitro and in vivo assays demonstrated that Verticillin A has the capacity to suppress metastatic colon carcinoma that displays chemoresistance to 5-fluorouracil [95]. The same study showed that Verticillin A also has the potential to overcome colon carcinoma that expresses resistance to FasL-induced apoptosis and can increase death receptor 5 (DR5), which leads to an effective suppression of resistance to DR5 agonist drozitumab-induced apoptosis [95]. The cell-free ELISA tyrosine kinase assay demonstrated that 11,11'-dideoxyverticillin A (**120**) has the capacity to inhibit the activity of vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) and epidermal growth factor receptor (EGFR) with an  $IC_{50}$  of  $1.645 \pm 0.885$  nM and  $0.136 \pm 0.109$  nM, respectively [97]. Those results demonstrate that 11,11'-dideoxyverticillin A has potent antitumor activity.

Another molecule of interest is chaetocin (**121**). Although its structure is similar to those of Verticillin A and 11,11'-dideoxyverticillin A, chaetocin is from marine-derived fungus *Nectria inventa* [98]. A unique property of this mycotoxin is its ability to act as a competitive inhibitor of S-adenosylmethionine by inhibiting SU(VAR)3–9 with an  $IC_{50}$  of 0.6  $\mu$ M [99]. Chaetocin also has the ability to inhibit SUV39H1, which has led some research teams to combine chaetocin with other epigenetic drugs to develop new therapeutic strategies against certain types of cancer, notably leukemia [100]. Moreover, it was also proved that chaetocin may induce cellular oxidative stress, mainly by inhibiting the redox enzyme thioredoxin reductase. An NCI-60 screening demonstrated that chaetocin can effectively inhibit cellular proliferation in solid tumor along with inducing apoptosis in every solid tumor tested by an oxidative damage mechanism [101].

The medicinal properties of naphthylisoquinoline alkaloid compounds extracted from Central African plants have already been well-studied. [102]. Li et al. reported the discovery of novel naphthylisoquinoline dimers extracted from the roots of the Congolese plant *Ancistrocladus ileboensis* (Figure 23) [103]. These dimers are jozilebomines A (**122**) and jozilebomines B (**123**). They were extracted along with the already known dimer jozimine A<sub>2</sub> (**124**), a C<sub>2</sub>-symmetric dimer that was isolated in 2013 from a Congolese *Ancistrocladus* species, which was the only known dioncophyllaceous dimer discovered in nature prior to the discovery of jozilebomines A and B [104]. The elucidation of the structure of jozilebomines A and B was achieved by 1D and 2D NMR, HRESIMS, oxidative degradation, and ECD data. All three dimers were tested for their cytotoxic activity against HeLa human cervical cancer cell line. The most potent compound is jozimine A<sub>2</sub> (**124**,  $IC_{50}$  of 0.22  $\mu$ M), followed by jozilebomines B (**123**,  $IC_{50}$ , 0.68  $\mu$ M) and jozilebomines A (**122**,  $IC_{50}$ , 1.08  $\mu$ M). The dimers were also tested for their activity against the PANC-1 human pancreatic cancer cell line and again, jozimine A<sub>2</sub> (**124**) was found to be the most effective compound ( $IC_{50}$  of 0.10  $\mu$ M), better than jozilebomines B (**123**,  $IC_{50}$ , 0.87  $\mu$ M) and jozilebomines A (**122**,  $IC_{50}$ , 2.24  $\mu$ M). In this case, the activity of jozimine A<sub>2</sub> was even stronger than that of the reference drug arctigenin ( $IC_{50}$  of 0.83  $\mu$ M). Finally, the antiplasmodial activity of the dimers was studied on a small series of protozoan parasites and all the dimers displayed some antiplasmodial activity. The most active molecules were Jozilebomines A and Jozilebomines B with an  $IC_{50}$  of 0.043  $\mu$ M and 0.102  $\mu$ M, respectively. However, these results are less promising than the antiplasmodial activity of jozimine A<sub>2</sub> ( $IC_{50}$  of 1.4 nM), which was evaluated on the strain NF54 of *Plasmodium falciparum*. These results demonstrate that C<sub>2</sub> symmetry is a key component in the biological activity of these compounds. With jozimine A<sub>2</sub> (**124**) being the naphthylisoquinoline alkaloids with the best antiplasmodial activity, its mechanism of action is currently under investigation [105].



**Figure 23.** Representation of the naphthylisoquinoline dimers jozilebomines A (**122**), jozilebomines B (**123**), and jozimine A<sub>2</sub> (**124**).

## 9. Summary and Conclusions

This review presented recent advances in the design of C<sub>2</sub>-symmetric biologically active molecules, which is a topic currently attracting the attention of many scientists. The main goal of designing dimeric drugs is the discovery of a compound with enhanced biological activity. A dimer may induce strong biological activity such as the silybin A dimer **60aa**, which was more active than the parent molecule **60a** on all cells tested, with the exception of skin cells (NAK) [54]. In addition, the testosterone dimer **6a** tested on three prostate cancer cell lines displayed activity 12 to 70 times stronger than that of the reference drug, cyproterone acetate [10]. Another interesting example is the pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine dimers **52** and **53**, which displayed cytotoxic activity in the picomolar range for all cancer cell lines tested [41]. Nevertheless, in some cases, dimerization leads to poor activity, such as for the unsaturated bis-norcantharimides dimers **38** and **39** [29] and for the ursolic and oleanolic acid dimers **80b** and **81b** [69]. The main cause for low biological activity is generally due to low solubility and bioavailability of the resulting compounds; hence, dimers of highly soluble drugs should be first considered as strong candidates for the likely outcome of potent new medicine. In this regard, natural products are a good source of hydrophilic biologically active molecules. Notably, isolation of marine natural products has led to the discovery of unique dimeric compounds such as the nitrophenyl *trans*-epoxyamides and the diketopiperazine [88,93]. Dimers extracted from plants can also lead to promising compounds, as is the case for jozimine A<sub>2</sub> (**124**) [104,105].

Another important consideration for designing dimeric drugs should be ease of synthesis. This can be achieved by classic reactions such the formation of ether bonds by Sn2/Sn1 reactions, ester or amide formation, anhydride chemistry, isocyanate chemistry, click chemistry, oxidative coupling of aromatic ring systems, etc. There is no doubt that a dimeric drug can produce higher biological activity, but the synthetic path should be short, efficient, and readily translated to the pharmaceutical industry. Otherwise, as we saw in this review, the goal of discovering a potent drug might simply not be attained. In summary, future developments in this field must be based on (i) careful selection of monomers, (ii) knowledge of mechanisms of action, and (iii) efficient synthesis leading to the desired dimeric molecules.

**Author Contributions:** A.P., C.R.-M. and G.B. contributed to the selection of key references, to the writing of the manuscript, and to the preparation of the figures. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.



**Funding:** This study was supported by grants from the Cancer Institute of Canadian Institutes of Health Research (CIHR; number 392334) the Cancer Research Society (CRS; number 22471), Aligo Innovation (number 150923) and the Ministère de l'Économie et de l'Innovation, Québec government to C. Reyes-Moreno and G. Bérubé.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Data available in a publicly accessible repository.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Bérubé, G. Natural and Synthetic Biologically Active Dimeric Molecules: Anticancer Agents, Anti-HIV Agents, Steroid Derivatives and Opioid Antagonists. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 131–154. [\[CrossRef\]](#)
- Portoghese, P.S. The role of concepts in structure-activity relationship studies of opioid ligands. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 1927–1937. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Tamiz, A.P.; Zhang, J.; Zhang, M.; Wang, C.Z.; Johnson, K.M.; Kozikowski, A.P. Application of the Bivalent Ligand Approach to the Design of Novel Dimeric Serotonin Reuptake Inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5393–5394. [\[CrossRef\]](#)
- Voloshchuk, T.; Farina, N.S.; Wauchope, O.R.; Kiprowska, M.; Haberfield, P.; Greer, A. Molecular Bilateral Symmetry of Natural Products: Prediction of Selectivity of Dimeric Molecules by Density Functional Theory and Semiempirical Calculations. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1141–1146. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Hadden, M.K.; Blagg, B.S.J. Dimeric approaches to anti-cancer chemotherapeutics. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2009**, *8*, 807–816. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Naha, L.; Sarker, S.D. *Steroid Dimers: Chemistry and Applications in Drug Design and Delivery*, 1st ed.; Wiley & Sons: West Sussex, UK, 2012; p. 440.
- Sumoto, K. Synthetic Studies on Developments for Bioactive New Leads of Oligovalent Symmetrical Molecules. *Yakugaku Zasshi* **2020**, *140*, 529–541. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Krstić, N.M.; Bjelaković, M.S.; Dabović, M.M.; Pavlović, V.D. Thionation of some  $\alpha,\beta$ -unsaturated steroidal ketones. *Molecules* **2010**, *15*, 3462–3477. [\[CrossRef\]](#)
- Krstić, N.M.; Matić, I.Z.; Juranić, Z.D.; Novaković, I.T.; Sladić, D.M. Steroid dimers—In vitro cytotoxic and antimicrobial activities. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2014**, *143*, 365–375. [\[CrossRef\]](#)
- Vesper, A.-R.; Lacroix, J.; C.-Gaudreault, R.; Tajmir-Riahi, H.-A.; Bérubé, G. Synthesis of novel C<sub>2</sub>-symmetric testosterone dimers and evaluation of antiproliferative activity on androgen-dependent and -independent prostate cancer cell lines. *Steroids* **2016**, *115*, 98–104. [\[CrossRef\]](#)
- Chanphai, P.; Vesper, A.; Bekale, L.; Berube, G.; Tajmir-Riahi, H. Encapsulation of testosterone and its aliphatic and aromatic dimers by milk beta-lactoglobulin. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *76*, 153–160. [\[CrossRef\]](#)
- Chanphai, P.; Vesper, A.; Bekale, L.; Berube, G.; Tajmir-Riahi, H. Transporting testosterone and its dimers by serum proteins. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2015**, *153*, 173–183. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Chanphai, P.; Vesper, A.-R.; Bariyanga, J.; Bérubé, G.; Tajmir-Riahi, H.-A. Review on the steroid delivery by carrier proteins. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2016**, *161*, 184–191. [\[CrossRef\]](#)
- Chanphai, P.; Agudelo, D.; Vesper, A.; Bérubé, G.; Tajmir-Riahi, H. Effect of testosterone and its aliphatic and aromatic dimers on DNA morphology. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *95*, 850–855. [\[CrossRef\]](#)
- Chanphai, P.; Agudelo, D.; Vesper, A.; Bérubé, G.; Tajmir-Riahi, H. Testosterone and its dimers alter tRNA morphology. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2017**, *134*, 269–274. [\[CrossRef\]](#)
- Bastien, D.; Leblanc, V.; Asselin, É.; Berube, G. First synthesis of separable isomeric testosterone dimers showing differential activities on prostate cancer cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 2078–2081. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Denisov, I.G.; Mak, P.J.; Grinkova, Y.V.; Bastien, D.; Bérubé, G.; Sligar, S.G.; Kincaid, J.R. The use of isomeric testosterone dimers to explore allosteric effects in substrate binding to cytochrome P450 CYP3A4. *J. Inorg. Biochem.* **2016**, *158*, 77–85. [\[CrossRef\]](#)
- Wendlandt, A.E.; Yelton, S.M.; Lou, D.; Watt, D.S.; Noonan, D.J. Synthesis and functional analysis of novel bivalent estrogens. *Steroids* **2010**, *75*, 825–833. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Peters, R.H.; Crowe, D.F.; Avery, M.A.; Chong, W.K.; Tanabe, M. 17-Desoxy estrogen analogues. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 1642–1652. [\[CrossRef\]](#)
- LaFrate, A.L.; Carlson, K.E.; Katzenellenbogen, J.A. Steroidal bivalent ligands for the estrogen receptor: Design, synthesis, characterization and binding affinities. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 3528–3535. [\[CrossRef\]](#)
- Knox, A.; Kalchschmid, C.; Schuster, D.; Gaggia, F.; Manzl, C.; Baecker, D.; Gust, R. Development of bivalent triarylalkene- and cyclofenil-derived dual estrogen receptor antagonists and downregulators. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *192*, 112191. [\[CrossRef\]](#)
- Willson, T.M.; Henke, B.R.; Momtahan, T.M.; Charifson, P.S.; Batchelor, K.W.; Lubahn, D.B.; Moore, L.B.; Oliver, B.B.; Sauls, H.R.; Triantafyllou, J.A.; et al. 3-[4-(1,2-Diphenylbut-1-enyl)phenyl]acrylic Acid: A Non-Steroidal Estrogen with Functional Selectivity for Bone over Uterus in Rats. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1550–1552. [\[CrossRef\]](#)

23. Bentrem, D.; Dardes, R.; Liu, H.; MacGregor-Schafer, J.; Zapf, J.; Jordan, V.C. Molecular mechanism of action at estrogen receptor alpha of a new clinically relevant antiestrogen (GW7604) related to tamoxifen. *J. Endocrinol.* **2001**, *142*, 838–846. [[CrossRef](#)]
24. Kieser, K.J.; Kim, D.W.; Carlson, K.E.; Katzenellenbogen, B.S.; Katzenellenbogen, J.A. Characterization of the Pharmacophore Properties of Novel Selective Estrogen Receptor Downregulators (SERDs). *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 3320–3329. [[CrossRef](#)]
25. Krejzová, J.; Šimon, P.; Vavříková, E.; Slámová, K.; Pelantová, H.; Riva, S.; Spiwok, V.; Křen, V. Enzymatic synthesis of new C-6-acylated derivatives of NAG-thiazoline and evaluation of their inhibitor activities towards fungal  $\beta$ -N-acetylhexosamidase. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2013**, *87*, 128–134. [[CrossRef](#)]
26. Baraniak, D.; Ruszkowski, P.; Baranowski, D.; Framski, G.; Boryski, J. Nucleoside dimers analogs containing floxuridine and thymidine with unnatural linker groups: Synthesis and cancer line studies. Part III. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2019**, *38*, 980–1005. [[CrossRef](#)]
27. Michalska, L.; Wawrzyniak, D.; Szymańska-Michalak, A.; Barciszewski, J.; Boryski, J.; Baraniak, D. Synthesis and biological assay of new 2'-deoxyuridine dimers containing a 1,2,3-triazole linker. Part I. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2018**, *38*, 1–18. [[CrossRef](#)]
28. Baraniak, D.; Baranowski, D.; Ruszkowski, P.; Boryski, J. Nucleoside dimers analogues with a 1,2,3-triazole linkage: Conjugation of floxuridine and thymidine provides novel tools for cancer treatment. Part II. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2019**, *38*, 807–835. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Cheng, S.-S.; Shi, Y.; Ma, X.-N.; Xing, D.-X.; Liu, L.-D.; Liu, Y.; Zhao, Y.-X.; Sui, Q.-C.; Tan, X.-J. Synthesis, crystal structure, spectroscopic properties and potential anti-cancerous activities of four unsaturated bis-norcantharimides. *J. Mol. Struct.* **2016**, *1115*, 228–240. [[CrossRef](#)]
30. Furutachi, M.; Ota, K.; Fujisaki, F.; Ikeda, R.; Yoshikawa, N.; Yokota, T.; Takeda, Y.; Yokomizo, K.; Zhou, J.-R.; Kashige, N.; et al. Anti-proliferative Activities of Some Bivalent Symmetrical 5-Substituted Hydantoin Derivatives towards Human Brain Glioma U251 Cells (U251) and Human Carcinoma Cells (KB3-1). *Biol. Pharm. Bull.* **2019**, *42*, 1953–1956. [[CrossRef](#)]
31. Fujisaki, F.; Aki, H.; Naito, A.; Fukami, E.; Kashige, N.; Miake, F.; Sumoto, K. Synthesis of New 5-Substituted Hydantoins and Symmetrical Twin-Drug Type Hydantoin Derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* **2014**, *62*, 429–438. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Fujisaki, F.; Toyofuku, K.; Egami, M.; Ishida, S.; Nakamoto, N.; Kashige, N.; Miake, F.; Sumoto, K. Antibacterial Activity of Some 5-Dialkylaminomethylhydantoins and Related Derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* **2013**, *61*, 1090–1093. [[CrossRef](#)]
33. Sumoto, K.; Furutachi, M.; Fujisaki, F.; Fujiwara, R.; Okabe, M.; Aki, H.; Kashige, N.; Miake, F. Preparation and Antibacterial Evaluation of Some Symmetrical Twin-Drug Type Bivalent Molecules. *Heterocycles* **2015**, *91*, 1668–1677. [[CrossRef](#)]
34. Sumoto, K.; Furutachi, M.; Gondo, T.; Goto, S.; Fuchigami, S.; Ako, K.; Oowada, Y.; Yokomizo, K.; Zhou, J.-R.; Ishizaki, T.; et al. Novel C2-Symmetrical Phenylboronic Acid Pinacol Esters with a Few Types of Linkers and Their Biological Activities. *Heterocycles* **2017**, *94*, 1748–1758. [[CrossRef](#)]
35. Furutachi, M.; Gondo, T.; Ikeda, R.; Yoshikawa, N.; Yokota, T.; Takeda, Y.; Yokomizo, K.; Zhou, J.-R.; Kashige, N.; Miake, F.; et al. Anti-proliferative Activities towards Human Brain Glioma U251 Cells and Human Carcinoma Cells (KB3-1) of Some Twin-Drug Type Bivalent C2-Symmetrical Phenylboronic Acid Derivatives. *Biol. Pharm. Bull.* **2019**, *42*, 833–836. [[CrossRef](#)]
36. Sumoto, K.; Furutachi, M.; Ejima, A.; Tsuru, R.; Goto, S.; Gondo, T.; Ako, K.; Fuchigami, S.; Fujii, S.; Okumura, A.; et al. Preparation and Biological Activity of Novel Twin-Drug Type C2-Symmetrical Cyclic Phenylboronic Acid Derivatives. *Heterocycles* **2017**, *95*, 517–524. [[CrossRef](#)]
37. Sumoto, K.; Furutachi, M.; Matsumoto, A.; Tamenaga, T.; Sugita, A.; Kuroiwa, M.; Yokomizo, K.; Zhou, J.-R.; Kashige, N.; Miake, F. Preparation of Novel Bivalent Linker Mode Phenylboronic Acid Derivatives and Their Biological Evaluation. *Heterocycles* **2018**, *96*, 1088–1100. [[CrossRef](#)]
38. Tendler, M.D.; Korman, S. 'Refuin': A Non-cytotoxic Carcinostatic Compound proliferated by a Thermophilic Actinomycete. *Nat. Cell Biol.* **1963**, *199*, 501. [[CrossRef](#)]
39. Bose, D.S.; Thompson, A.S.; Ching, J.; Hartley, J.A.; Berardini, M.D.; Jenkins, T.C.; Neidle, S.; Hurley, L.H.; Thurston, D.E. Rational design of a highly efficient irreversible DNA interstrand cross-linking agent based on the pyrrolobenzodiazepine ring system. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4939–4941. [[CrossRef](#)]
40. Howard, P.W.; Chen, Z.; Gregson, S.J.; Masterson, L.A.; Tiberghien, A.C.; Cooper, N.; Fang, M.; Coffils, M.J.; Klee, S.; Hartley, J.A.; et al. Synthesis of a novel C2/C2'-aryl-substituted pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine dimer prodrug with improved water solubility and reduced DNA reaction rate. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6463–6466. [[CrossRef](#)]
41. Hartley, J.A.; Hamaguchi, A.; Coffils, M.; Martin, C.R.; Suggitt, M.; Chen, Z.; Gregson, S.J.; Masterson, L.A.; Tiberghien, A.C.; Hartley, J.M.; et al. SG2285, a Novel C2-Aryl-Substituted Pyrrolobenzodiazepine Dimer Prodrug That Cross-links DNA and Exerts Highly Potent Antitumor Activity. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 6849–6858. [[CrossRef](#)]
42. Howard, P.W.; Gregson, S.J. Pyrrolobenzodiazepines. Conjugates. Patent WO/2018/069490, 14 October 2016.
43. Tiberghien, A.C.; Levy, J.-N.; Masterson, L.A.; Patel, N.V.; Adams, L.R.; Corbett, S.; Williams, D.G.; Hartley, J.A.; Howard, P.W. Design and Synthesis of Tesirine, a Clinical Antibody-Drug Conjugate Pyrrolobenzodiazepine Dimer Payload. *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, *7*, 983–987. [[CrossRef](#)]
44. Hartley, J.A.; Flynn, M.J.; Bingham, J.P.; Corbett, S.; Reinert, H.; Tiberghien, A.; Masterson, L.A.; Antonow, D.; Adams, L.; Chowdhury, S.; et al. Pre-clinical pharmacology and mechanism of action of SG3199, the pyrrolobenzodiazepine (PBD) dimer warhead component of antibody-drug conjugate (ADC) payload tesirine. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–10. [[CrossRef](#)]



45. Lashari, B.H.; Vallatharasu, Y.; Kolandra, L.; Hamid, M.; Uprety, D. Rovalpituzumab Tesirine: A Novel DLL3-Targeting Antibody–Drug Conjugate. *Drugs R&D* **2018**, *18*, 255–258. [CrossRef]
46. AbbVie News Center. Available online: <https://news.abbvie.com/news/press-releases/abbvie-discontinues-rovalpituzumab-tesirine-rova-t-research-and-development-program.htm> (accessed on 20 June 2020).
47. Sahoo, B.; Dinda, S.; Kumar, B.; Panda, J.; Brahmshatriya, P. Design, Green Synthesis, and Anti-Inflammatory Activity of Schiff Base of 1,3,4-oxadiazole Analogues. *Lett. Drug Des. Discov.* **2013**, *11*, 82–89. [CrossRef]
48. Özkay, Y.; Işıkdag, I.; Incesu, Z.; Akalın, G. Synthesis of 2-substituted-N-[4-(1-methyl-4,5-diphenyl-1H-imidazole-2-yl)phenyl]acetamide derivatives and evaluation of their anticancer activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 3320–3328. [CrossRef]
49. Harrison, T.S.; Keating, G.M. Zolpidem: A review of its use in the management of insomnia. *CNS Drugs* **2005**, *19*, 65–89. [CrossRef] [PubMed]
50. Zivkovic, B.; Morel, E.; Joly, D.; Perrault, G.; Sanger, D.J.; Lloyd, K.G. Pharmacological and Behavioral Profile of Alpidem as an Anxiolytic. *Pharmacopsychiatry* **1990**, *23*, 108–113. [CrossRef] [PubMed]
51. Meenakshisundaram, S.; Manickam, M.; Pillaiyar, T. Exploration of imidazole and imidazopyridine dimers as anticancer agents: Design, synthesis, and structure–activity relationship study. *Archiv Pharmazie* **2019**, *352*, e1900011. [CrossRef] [PubMed]
52. Guchhait, S.K.; Chandgude, A.L.; Priyadarshani, G. CuSO<sub>4</sub>–Glucose for in Situ Generation of Controlled Cu(I)–Cu(II) Bicyclic Catalysts: Multicomponent Reaction of Heterocyclic Azine and Aldehyde with Alkyne, and Cycloisomerization toward Synthesis of N-Fused Imidazoles. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 4438–4444. [CrossRef] [PubMed]
53. Panche, A.N.; Diwan, A.D.; Chandra, S.R. Flavonoids: An overview. *J. Nutr. Sci.* **2016**, *5*, e47. [CrossRef]
54. Vavříková, E.; Vacek, J.; Valentova, K.; Marhol, P.; Ulrichová, J.; Kuzma, M.; Křen, V. Chemo-Enzymatic Synthesis of Silybin and 2,3-Dehydrosilybin Dimers. *Molecules* **2014**, *19*, 4115–4134. [CrossRef] [PubMed]
55. Huber, A.; Thongphasuk, P.; Erben, G.; Lehmann, W.-D.; Tuma, S.; Stremmel, W.; Chamulitrat, W. Significantly greater antioxidant anticancer activities of 2,3-dehydrosilybin than silybin. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2008**, *1780*, 837–847. [CrossRef]
56. Gažák, R.; Svobodová, A.; Psotová, J.; Sedmera, P.; Příkrylová, V.; Walterová, D.; Křen, V. Oxidised derivatives of silybin and their antiradical and antioxidant activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 5677–5687. [CrossRef] [PubMed]
57. Chebil, L.; Humeau, C.; Falcimaigne, A.; Engasser, J.-M.; Ghoul, M. Enzymatic acylation of flavonoids. *Process. Biochem.* **2006**, *41*, 2237–2251. [CrossRef]
58. Walterova, D.; Kren, V. Silybin and Silymarin—New and Emerging Applications in Medicine. *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 315–338. [CrossRef]
59. Graf, T.; Wani, M.; Agarwal, R.; Kroll, D.; Oberlies, N. Gram-Scale Purification of Flavonolignan Diastereoisomers from *Silybum marianum* (Milk Thistle) Extract in Support of Preclinical in vivo Studies for Prostate Cancer Chemoprevention. *Planta Med.* **2007**, *73*, 1495–1501. [CrossRef] [PubMed]
60. Gavezzotti, P.; Vavrikova, E.; Valentova, K.; Fronza, G.; Kudanga, T.; Kuzma, M.; Riva, S.; Biedermann, D.; Kren, V. Enzymatic oxidative dimerization of silymarin flavonolignans. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2014**, *109*, 24–30. [CrossRef]
61. Pertino, M.W.; Theoduloz, C.; Bastías, M.; Schmeda-Hirschmann, G. Dimeric Labdane Diterpenes: Synthesis and Antiproliferative Effects. *Molecules* **2013**, *18*, 5936–5953. [CrossRef]
62. Romanucci, V.; Gravante, R.; Cimafonte, M.; Di Marino, C.; Mailhot, G.; Brigante, M.; Zarrelli, A.; Di Fabio, G. Phosphate-Linked Silibinin Dimers (PLSd): New Promising Modified Metabolites. *Molecules* **2017**, *22*, 1323. [CrossRef]
63. Romanucci, V.; Zarrelli, A.; Guaragna, A.; Di Marino, C.; Di Fabio, G. New phosphorylating reagents for deoxyribonucleosides and oligonucleotides. *Tetrahedron Lett.* **2017**, *58*, 1227–1229. [CrossRef]
64. Joe, B.; Vijaykumar, M.; Lokesh, B.R. Biological Properties of Curcumin—Cellular and Molecular Mechanisms of Action. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2004**, *44*, 97–111. [CrossRef] [PubMed]
65. Wang, Y.-J.; Pan, M.-H.; Cheng, A.-L.; Lin, L.-I.; Ho, Y.-S.; Hsieh, C.-Y.; Lin, J.-K. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1997**, *15*, 1867–1876. [CrossRef]
66. Marchiani, A.; Mammì, S.; Siligardi, G.; Hussain, R.; Tessari, I.; Bubacco, L.; Delogu, G.; Fabbri, D.; Dettori, M.A.; Sanna, D.; et al. Small molecules interacting with  $\alpha$ -synuclein: Antiaggregating and cytoprotective properties. *Amino Acids* **2013**, *45*, 327–338. [CrossRef]
67. Sultana, R. Ferulic acid ethyl ester as a potential therapy in neurodegenerative disorders. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2012**, *1822*, 748–752. [CrossRef] [PubMed]
68. Slavova-Kazakova, A.K.; Angelova, S.E.; Veprintsev, T.L.; Denev, P.; Fabbri, D.; Dettori, M.A.; Kratchanova, M.; Naumov, V.V.; Trofimov, A.V.; Vasil'ev, R.F.; et al. Antioxidant potential of curcumin-related compounds studied by chemiluminescence kinetics, chain-breaking efficiencies, scavenging activity (ORAC) and DFT calculations. *Beilstein J. Org. Chem.* **2015**, *11*, 1398–1411. [CrossRef] [PubMed]
69. Hoenke, S.; Wiengarn, I.; Serbian, I.; Al-Harrasi, A.; Csuk, R. Synthesis of amide-spacer dimers of ursolic and oleanolic acid. *Mediterr. J. Chem.* **2019**, *9*, 24–36. [CrossRef]
70. Kahnt, M.; Fisher, L.; Al-Harrasi, A.; Csuk, R. Ethylenediamine Derived Carboxamides of Betulinic and Ursolic Acid as Potential Cytotoxic Agents. *Molecules* **2018**, *23*, 2558. [CrossRef] [PubMed]
71. Heller, L.; Knorrscheidt, A.; Flemming, F.; Wiemann, J.; Sommerwerk, S.; Pavel, I.Z.; Al-Harrasi, A.; Csuk, R. Synthesis and proapoptotic activity of oleanolic acid derived amides. *Bioorg. Chem.* **2016**, *68*, 137–151. [CrossRef]



72. Sommerwerk, S.; Heller, L.; Kuhfs, J.; Csuk, R. Selective killing of cancer cells with triterpenoic acid amides—The substantial role of an aromatic moiety alignment. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *122*, 452–464. [[CrossRef](#)]
73. Tan, Q.-G.; Luo, X.-D. Meliaceoous Limonoids: Chemistry and Biological Activities. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 7437–7522. [[CrossRef](#)]
74. Roy, A.; Saraf, S. Limonoids: Overview of Significant Bioactive Triterpenes Distributed in Plants Kingdom. *Biol. Pharm. Bull.* **2006**, *29*, 191–201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Li, W.S.; Wu, J.; Li, J.; Satyanandamurty, T.; Shen, L.; Bringmann, G. Krishnadimer A, an Axially Chiral Non-biaryl Natural Product: Discovery and Biomimetic Synthesis. *Org. Lett.* **2016**, *19*, 182–185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Li, W.S.; Yang, Y.; Liu, J.J.; Shen, L.; Shi, Z.; Wu, J. Scaffold diversity-oriented synthesis of limonoid dimers: Discovery of an axially chiral agent with in vivo anti-breast cancer activity. *Org. Chem. Front.* **2018**, *5*, 1079–1091. [[CrossRef](#)]
77. Li, M.-Y.; Yang, S.-X.; Pan, J.-Y.; Xiao, Q.; Satyanandamurty, T.; Wu, J. Moluccensins A–G, Phragmalins with a Conjugated C-30 Carbonyl Group from a Krishna Mangrove, *Xylocarpus moluccensis*. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 1657–1662. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Antoszczak, M.; Rutkowski, J.; Huczynski, A. Structure and Biological Activity of Polyether Ionophores and Their Semisynthetic Derivatives. In *Bioactive Natural Products*; Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2015; pp. 107–170.
79. Zardavas, D.; Baselga, J.; Piccart-Gebhart, M. Emerging targeted agents in metastatic breast cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2013**, *10*, 191–210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Antoszczak, M.; Huczynski, A. Anticancer Activity of Polyether Ionophore-Salinomycin. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2015**, *15*, 575–591. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Huang, M.; Deng, Z.; Tian, J.; Liu, T. Synthesis and biological evaluation of salinomycin triazole analogues as anticancer agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *127*, 900–908. [[CrossRef](#)]
82. Antoszczak, M.; Maj, E.; Borgström, B.; Oredsson, S.; Huczynski, A.; Wietrzyk, J.; Strand, D. Bivalent polyether ionophores: Synthesis and biological evaluation of C2-symmetric salinomycin dimers. *Tetrahedron Lett.* **2017**, *58*, 2396–2399. [[CrossRef](#)]
83. Machado, L.; Spengler, G.; Evaristo, M.; Handzlik, J.; Molnár, J.; Viveiros, M.; Kiec-Kononowicz, K.; Amaral, L. Biological activity of twenty-three hydantoin derivatives on intrinsic efflux pump system of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis NCTC 13349. *In Vivo* **2011**, *25*, 769–772.
84. Sumoto, K.; Furutachi, M.; Fujisaki, F.; Tsuru, R.; Ejima, A.; Gondo, T.; Goto, S.; Ito, M.; Nakamura, M.; Aki, H.; et al. Synthesis and Antibacterial Evaluation of Some New 5-Substituted Hydantoins and Novel Twin-Drug Type Derivatives. *Heterocycles* **2016**, *92*, 1111–1120. [[CrossRef](#)]
85. Lakshmi, R.; Nusrin, K.S.; Georgy, S.A.; Sreelakshmi, K.S. Role of Beta Lactamases in Antibiotic Resistance: A review. *Int. Res. J. Pharm.* **2014**, *5*, 37–40. [[CrossRef](#)]
86. Banik, I.; Becker, A.F.F.; Banik, B.K. Stereoselective Synthesis of  $\beta$ -Lactams with Polyaromatic Imines: Entry to New and Novel Anticancer Agents. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 12–15. [[CrossRef](#)]
87. Meenakshisundaram, S.; Manickam, M.F.; Vinayagam, V. Synthesis, antibacterial and anticancer activity of novel bis-azetidiones. *J. Chem. Pharm. Res.* **2016**, *8*, 733–742.
88. Chen, S.; Wang, J.; Lin, X.; Zhao, B.; Wei, X.; Li, G.; Kaliaperumal, K.; Liao, S.; Yang, B.; Zhou, X.; et al. Chrysamides A–C, Three Dimeric Nitrophenyl trans-Epoxyamides Produced by the Deep-Sea-Derived Fungus *Penicillium chrysogenum* SCSIO41001. *Org. Lett.* **2016**, *18*, 3650–3653. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Gomes, N.G.M.; Pereira, R.B.; Andrade, P.B.; Valentão, P. Double the Chemistry, Double the Fun: Structural Diversity and Biological Activity of Marine-Derived Diketopiperazine Dimers. *Mar. Drugs* **2019**, *17*, 551. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Carroll, A.R.; Copp, B.R.; Davis, R.A.; Keyzers, R.A.; Prinsep, M.R. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2019**, *36*, 122–173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Sedlock, D.M.; Barrow, C.J.; Brownell, J.E.; Hong, A.; Gillum, A.M.; Houck, D.R. WIN 64821, a novel neurokinin antagonist produced by an *Aspergillus* sp. I. Fermentation and isolation. *J. Antibiot.* **1994**, *47*, 391–398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Ding, L.; Li, F.C.; Qin, M.; Qin, S.; Kelter, G.; Fiebig, H.H.; Laatsch, H. Anti-tumor compounds isolated from marine *Aspergillus* sp. *Chin. J. Nat. Med.* **2008**, *6*, 421–424. [[CrossRef](#)]
93. Barrow, C.J.; Musza, L.L.; Cooper, R. Structure-activity studies of the natural product substance P antagonist win 64821. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 377–380. [[CrossRef](#)]
94. Son, B.W.; Jensen, P.R.; Kauffman, C.A.; Fenical, W. New Cytotoxic Epidithiodioxopiperazines Related to Verticillin A from a Marine Isolate of the Fungus *Penicillium*. *Nat. Prod. Lett.* **1999**, *13*, 213–222. [[CrossRef](#)]
95. Paschall, A.V.; Yang, D.; Lu, C.; Choi, J.-H.; Li, X.; Liu, F.; Figueroa, M.; Oberlies, N.H.; Pearce, C.J.; Bollag, W.B.; et al. H3K9 Trimethylation Silences Fas Expression to Confer Colon Carcinoma Immune Escape and 5-Fluorouracil Chemoresistance. *J. Immunol.* **2015**, *195*, 1868–1882. [[CrossRef](#)]
96. Lu, C.; Paschall, A.V.; Shi, H.; Savage, N.; Waller, J.L.; Sabbatini, M.E.; Oberlies, N.H.; Pearce, C.; Liu, K. The MLL1-H3K4me3 Axis-Mediated PD-L1 Expression and Pancreatic Cancer Immune Evasion. *J. Natl. Cancer Inst.* **2017**, *109*, djw283. [[CrossRef](#)]
97. Zhang, Y.-X.; Chen, Y.; Guo, X.-N.; Zhang, X.-W.; Zhao, W.-M.; Zhong, L.; Zhou, J.; Xi, Y.; Lin, L.-P.; Ding, J. 11,11'-Dideoxy-verticillin: A natural compound possessing growth factor receptor tyrosine kinase-inhibitory effect with anti-tumor activity. *Anticancer Drugs* **2005**, *16*, 515–524. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Watts, K.R.; Ratnam, J.; Ang, K.-H.; Tenney, K.; Compton, J.E.; McKerrow, J.; Crews, P. Assessing the trypanocidal potential of natural and semi-synthetic diketopiperazines from two deep water marine-derived fungi. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 2566–2574. [[CrossRef](#)]

99. Greiner, D.; Bonaldi, T.; Eskeland, R.; Roemer, E.; Imhof, A. Identification of a specific inhibitor of the histone methyltransferase SU(VAR)3-9. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 143–145. [[CrossRef](#)]
100. Lai, Y.-S.; Chen, J.-Y.; Tsai, H.-J.; Chen, T.-Y.; Hung, W.-C. The SUV39H1 inhibitor chaetocin induces differentiation and shows synergistic cytotoxicity with other epigenetic drugs in acute myeloid leukemia cells. *Blood Cancer J.* **2015**, *5*, e313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Isham, C.R.; Tibodeau, J.D.; Bossou, A.R.; Merchan, J.R.; Bible, K.C. The anticancer effects of chaetocin are independent of programmed cell death and hypoxia, and are associated with inhibition of endothelial cell proliferation. *Br. J. Cancer* **2011**, *106*, 314–323. [[CrossRef](#)]
102. Zofou, D.; Ntie-Kang, F.; Sippl, W.; Efange, S.M.N. Bioactive natural products derived from the Central African flora against neglected tropical diseases and HIV. *Nat. Prod. Rep.* **2013**, *30*, 1098–1120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Li, J.; Seupel, R.; Bruhn, T.; Feineis, D.; Kaiser, M.; Brun, R.; Mudogo, V.; Awale, S.; Bringmann, G. Jozilebomines A and B, Naphthylisoquinoline Dimers from the Congolese Liana *Ancistrocladus ileboensis*, with Antiausterity Activities against the PANC-1 Human Pancreatic Cancer Cell Line. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 2807–2817. [[CrossRef](#)]
104. Bringmann, G.; Zhang, G.; Büttner, T.; Bauckmann, G.; Kupfer, T.; Braunschweig, H.; Brun, R.; Mudogo, V. Jozimine A2: The First Dimeric Dioncophyllaceae-Type Naphthylisoquinoline Alkaloid, with Three Chiral Axes and High Antiplasmodial Activity. *Chem. A Eur. J.* **2012**, *19*, 916–923. [[CrossRef](#)]
105. Bilonda, M.K.; Mammino, L. Computational Study of Jozimine A2, a Naphthylisoquinoline Alkaloid with Antimalarial Activity. In *Concepts, Methods and Applications of Quantum Systems in Chemistry and Physics*, 1st ed.; Wang, Y.A., Thachuk, M., Krems, R., Maruani, J., Eds.; Springer: Vancouver, BC, Canada, 2018; pp. 305–328.

## RÉFÉRENCES

1. Lee, C. H.; Akin-Olugbade, O.; Kirschenbaum, A., Overview of prostate anatomy, histology, and pathology. *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.* **2011**, *40* (3), 565-575.
2. Kumar, V. L.; Majumder, P. K., Prostate gland: structure, functions and regulation. *Int. Urol. Nephrol.* **1995**, *27* (3), 231-243.
3. Verze, P.; Cai, T.; Lorenzetti, S., The role of the prostate in male fertility, health and disease. *Nat. Rev. Urol.* **2016**, *13* (7), 379-386.
4. Lefèvre, P. L. C.; Palin, M.-F.; Murphy, B. D., Polyamines on the reproductive landscape. *Endocr. Rev.* **2011**, *32* (5), 694-712.
5. de Lamirande, E., Semenogelin, The main protein of the human semen coagulum, regulates sperm function. *Semin. Thromb. Hemost.* **2007**, *33* (1), 060-068.
6. McNeal, J. E., Normal histology of the prostate. *Am. J. Surg. Pathol.* **1988**, *12* (8), 619-633.
7. Isaacs, J. T., Prostatic structure and function in relation to the etiology of prostatic cancer. *Prostate* **1983**, *4* (4), 351-366.
8. Fine, S. W.; Al-Ahmadie, H. A.; Gopalan, A.; Tickoo, S. K.; Scardino, P. T.; Reuter, V. E., Anatomy of the anterior prostate and extraprostatic space: a contemporary surgical pathology analysis. *Adv. Anat. Pathol.* **2007**, *14* (6), 401-407.
9. Iwakiri, J.; Grandbois, K.; Wehner, N.; Graves, H. C. B.; Stamey, T., An analysis of urinary prostate specific antigen before and after radical prostatectomy: evidence for secretion of prostate specific antigen by the periurethral glands. *J. Urol.* **1993**, *149* (4), 783-786.
10. Sarkar, S.; Horn, G.; Moulton, K.; Oza, A.; Byler, S.; Kokolus, S.; Longacre, M., Cancer development, progression, and therapy: an epigenetic overview. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14* (10), 21087-21113.
11. Kaczanowski, S., Apoptosis: its origin, history, maintenance and the medical implications for cancer and aging. *Phys. Biol.* **2016**, *13* (3).
12. Ziaee, S.; Chu, G. C.; Huang, J. M.; Sieh, S.; Chung, L. W., Prostate cancer metastasis: roles of recruitment and reprogramming, cell signal network and three-dimensional growth characteristics. *Transl. Androl. Urol.* **2015**, *4* (4), 438-54.
13. Litwin, M. S.; Tan, H. J., The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review. *JAMA* **2017**, *317* (24), 2532-2542.
14. Baig, F. A.; Hamid, A.; Mirza, T.; Syed, S., Ductal and acinar adenocarcinoma of prostate: morphological and immunohistochemical characterization. *Oman Med. J.* **2015**, *30* (3), 162-166.

15. McNeal, J. E.; Redwine, E. A.; Freiha, F. S.; Stamey, T. A., Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma. Correlation with histologic pattern and direction of spread. *Am. J. Surg. Pathol.* **1988**, *12* (12), 897-906.
16. Shah, R. B.; Zhou, M., Histologic variants of acinar adenocarcinoma, ductal adenocarcinoma, neuroendocrine tumors, and other carcinomas. In *Prostate Biopsy Interpretation*, 2019; pp 69-95.
17. Hoof, P.; Tsai-Nguyen, G.; Paulson, S.; Syed, A.; Mora, A., Neuroendocrine carcinoma of the prostate gland. *Bayl. Univ. Med. Cent.* **2017**, *29* (1), 68-69.
18. Nicolaisen, G. S.; Williams, R. D., Primary transitional cell carcinoma of prostate. *Urology* **1984**, *24* (6), 544-549.
19. Munoz, F.; Franco, P.; Ciammella, P.; Clerico, M.; Giudici, M.; Filippi, A.; Ricardi, U., Squamous cell carcinoma of the prostate: long-term survival after combined chemoradiation. *Radiat. Oncol.* **2007**, *2* (1).
20. Sexton, W. J.; Lance, R. E.; Reyes, A. O.; Pisters, P. W. T.; Tu, S.-M.; Pisters, L. L., Adult prostate sarcoma: the M. D. Anderson Cancer Center experience. *J. Urol.* **2001**, *166* (2), 521-525.
21. Tosev, G.; Kuru, T. H.; Huber, J.; Freier, G.; Bergmann, F.; Hassel, J. C.; Pahernik, S. A.; Hohenfellner, M.; Hadaschik, B. A., Primary melanoma of the prostate: case report and review of the literature. *BMC Urol.* **2015**, *15* (1).
22. Borley, N.; Feneley, M. R., Prostate cancer: diagnosis and staging. *Asian J. Androl.* **2008**, *11* (1), 74-80.
23. Delahunt, B.; Miller, R. J.; Srigley, J. R.; Evans, A. J.; Samaratunga, H., Gleason grading: past, present and future. *Histopathology* **2012**, *60* (1), 75-86.
24. Chen, N.; Zhou, Q., The evolving Gleason grading system. *Chin J Cancer Res* **2016**, *28* (1), 58-64.
25. Wang, Y. Z.; Wong, Y. C., Oncogenes and tumor suppressor genes in prostate cancer: a review. *Urol. Oncol.: Semin. Orig. Investig.* **1997**, *3* (2), 41-46.
26. Dong, J.-T., Prevalent mutations in prostate cancer. *Journal of Cellular Biochemistry* **2006**, *97* (3), 433-447.
27. Bratt, O., Hereditary prostate cancer: clinical aspects. *J. Urol.* **2002**, *168* (3), 906-13.
28. Sun, X.; Frierson, H. F.; Chen, C.; Li, C.; Ran, Q.; Otto, K. B.; Cantarel, B. M.; Vessella, R. L.; Gao, A. C.; Petros, J.; Miura, Y.; Simons, J. W.; Dong, J.-T., Frequent somatic mutations of the transcription factor ATBF1 in human prostate cancer. *Nat. Genet.* **2005**, *37* (4), 407-412.
29. Thompson, D., Cancer Incidence in BRCA1 mutation carriers. *J. Natl. Cancer Inst.* **2002**, *94* (18), 1358-1365.
30. Kirchoff, T.; Kauff, N. D.; Mitra, N.; Nafa, K.; Huang, H.; Palmer, C.; Gulati, T.; Wadsworth, E.; Donat, S.; Robson, M. E.; Ellis, N. A.; Offit, K., BRCA mutations and risk of prostate cancer in ashkenazi jews. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10* (9), 2918-2921.
31. Kibel, A. S.; Suarez, B. K.; Belani, J.; Oh, J.; Webster, R.; Brophy-Ebbers, M.; Guo, C.; Catalona, W. J.; Picus, J.; Goodfellow, P. J., CDKN1A and CDKN1B polymorphisms and risk of advanced prostate carcinoma. *Cancer Res.* **2003**, *63* (9), 2033-6.
32. Dong, X.; Wang, L.; Taniguchi, K.; Wang, X.; Cunningham, J. M.; McDonnell, S. K.; Qian, C.; Marks, A. F.; Slager, S. L.; Peterson, B. J.; Smith, D. I.; Chevillat, J. C.; Blute, M. L.;

- Jacobsen, S. J.; Schaid, D. J.; Tindall, D. J.; Thibodeau, S. N.; Liu, W., Mutations in CHEK2 associated with prostate cancer risk. *Am. J. Hum. Genet.* **2003**, *72* (2), 270-80.
33. Leighton, X.; Eidelman, O.; Jozwik, C.; Pollard, H. B.; Srivastava, M., ANXA7-GTPase as tumor suppressor: mechanisms and therapeutic opportunities. *Methods Mol. Biol.* **2017**, *1513*, 23-35.
34. Huusko, P.; Ponciano-Jackson, D.; Wolf, M.; Kiefer, J. A.; Azorsa, D. O.; Tuzmen, S.; Weaver, D.; Robbins, C.; Moses, T.; Allinen, M.; Hautaniemi, S.; Chen, Y.; Elkahoul, A.; Basik, M.; Bova, G. S.; Bubendorf, L.; Lugli, A.; Sauter, G.; Schleutker, J.; Ozelik, H.; Elowe, S.; Pawson, T.; Trent, J. M.; Carpten, J. D.; Kallioniemi, O. P.; Mousset, S., Nonsense-mediated decay microarray analysis identifies mutations of EPHB2 in human prostate cancer. *Nat. Genet.* **2004**, *36* (9), 979-83.
35. Knuutila, S.; Bjorkqvist, A. M.; Autio, K.; Tarkkanen, M.; Wolf, M.; Monni, O.; Szymanska, J.; Larramendy, M. L.; Tapper, J.; Pere, H.; El-Rifai, W.; Hemmer, S.; Wasenius, V. M.; Vidgren, V.; Zhu, Y., DNA copy number amplifications in human neoplasms: review of comparative genomic hybridization studies. *Am. J. Pathol.* **1998**, *152* (5), 1107-23.
36. Anwar, K.; Nakakuki, K.; Shiraishi, T.; Naiki, H.; Yatani, R.; Inuzuka, M., Presence of ras oncogene mutations and human papillomavirus DNA in human prostate carcinomas. *Cancer Res.* **1992**, *52* (21), 5991-6.
37. Chang, T. K.; Chen, J.; Pillay, V.; Ho, J. Y.; Bandiera, S. M., Real-time polymerase chain reaction analysis of CYP1B1 gene expression in human liver. *Toxicol. Sci.* **2003**, *71* (1), 11-9.
38. Ntais, C.; Polycarpou, A.; Ioannidis, J. P., Association of the CYP17 gene polymorphism with the risk of prostate cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **2003**, *12* (2), 120-6.
39. Rebbeck, T. R.; Jaffe, J. M.; Walker, A. H.; Wein, A. J.; Malkowicz, S. B., Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J. Natl. Cancer. Inst.* **1998**, *90* (16), 1225-9.
40. Harries, L. W.; Stubbins, M. J.; Forman, D.; Howard, G. C.; Wolf, C. R., Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis* **1997**, *18* (4), 641-4.
41. Petros, J. A.; Baumann, A. K.; Ruiz-Pesini, E.; Amin, M. B.; Sun, C. Q.; Hall, J.; Lim, S.; Issa, M. M.; Flanders, W. D.; Hosseini, S. H.; Marshall, F. F.; Wallace, D. C., mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102* (3), 719-24.
42. Ferlay J, L. M., Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F, Global Cancer Observatory: cancer tomorrow. Lyon, France, 2020.
43. Society, A. C., Cancer facts and figures - 1997. American Cancer Society: Atlanta, GA, 1997.
44. Giovannucci, E., Epidemiologic characteristics of prostate cancer. *Cancer* **1995**, *75* (S7), 1766-1777.
45. Carter, B. S.; Beaty, T. H.; Steinberg, G. D.; Childs, B.; Walsh, P. C., Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1992**, *89* (8), 3367-3371.

46. Chan, J. M.; Stampfer, M. J.; Giovannucci, E. L., What causes prostate cancer? A brief summary of the epidemiology. *Semin. Cancer Biol.* **1998**, *8* (4), 263-273.
47. Giovannucci, E.; Ascherio, A.; Rimm, E. B.; Stampfer, M. J.; Colditz, G. A.; Willett, W. C., Intake of carotenoids and retino in relation to risk of prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **1995**, *87* (23), 1767-1776.
48. Clinton, S. K.; Emehiser, C.; Schwartz, S. J.; Bostwick, D. G.; Williams, A. W.; Moore, B. J.; Erdman, J. W., Jr., Cis-trans lycopene isomers, carotenoids, and retinol in the human prostate. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **1996**, *5* (10), 823-33.
49. Mantzoros, C. S.; Tzonou, A.; Signorello, L. B.; Stampfer, M.; Trichopoulos, D.; Adami, H. O., Insulin-like growth factor 1 in relation to prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Br. J. Cancer* **1997**, *76* (9), 1115-8.
50. Wolk, A.; Mantzoros, C. S.; Andersson, S. O.; Bergstrom, R.; Signorello, L. B.; Lagiou, P.; Adami, H. O.; Trichopoulos, D., Insulin-like growth factor 1 and prostate cancer risk: a population-based, case-control study. *J. Natl. Cancer Inst.* **1998**, *90* (12), 911-5.
51. Andersson, S. O.; Wolk, A.; Bergstrom, R.; Adami, H. O.; Engholm, G.; Englund, A.; Nyren, O., Body size and prostate cancer: a 20-year follow-up study among 135006 Swedish construction workers. *J. Natl. Cancer Inst.* **1997**, *89* (5), 385-9.
52. Huncharek, M.; Haddock, K. S.; Reid, R.; Kupelnick, B., Smoking as a risk factor for prostate cancer: a meta-analysis of 24 prospective cohort studies. *Am. J. Public Health* **2010**, *100* (4), 693-701.
53. Thune, I.; Lund, E., Physical activity and the risk of prostate and testicular cancer: a cohort study of 53,000 Norwegian men. *Cancer Causes & Control* **1994**, *5* (6), 549-556.
54. Bahadoran, Z.; Mirmiran, P.; Azizi, F.; Ghasemi, A., A brief history of modern endocrinology and definitions of a true hormone. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets* **2019**, *19* (8), 1116-1121.
55. Yadav, N.; Heemers, H. V., Androgen action in the prostate gland. *Minerva Urol. Nefrol.* **2012**, *64* (1), 35-49.
56. Roy, A. K.; Chatterjee, B., Androgen action. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **1995**, *5* (2), 157-76.
57. David J. Handelsman, Androgen physiology, pharmacology, use and misuse. In *Endotext*, South Dartmouth, NH, 2020.
58. Czub, M. P.; Venkataramany, B. S.; Majorek, K. A.; Handing, K. B.; Porebski, P. J.; Beeram, S. R.; Suh, K.; Woolfork, A. G.; Hage, D. S.; Shabalin, I. G.; Minor, W., Testosterone meets albumin - the molecular mechanism of sex hormone transport by serum albumins. *Chem. Sci.* **2019**, *10* (6), 1607-1618.
59. Davey, R. A.; Grossmann, M., Androgen receptor structure, function and biology: from bench to bedside. *Clin. Biochem. Rev.* **2016**, *37* (1), 3-15.
60. Feldman, B. J.; Feldman, D., The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2001**, *1* (1), 34-45.
61. Lu, M.; Lu, H.; Kong, Q., Leading causes of castration-resistant prostate cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2015**, *15* (4), 425-32.
62. Lepor, H., A review of surgical techniques for radical prostatectomy. *Rev. Urol.* **2005**, *7 Suppl 2*, S11-7.

63. Fosså, S. D.; Opjordsmoen, S.; Haug, E., Androgen replacement and quality of life in patients treated for bilateral testicular cancer. *Eur. J. Cancer* **1999**, *35* (8), 1220-1225.
64. Nag, S., Radioactive iodine-125 implantation for cancer of the prostate. *Prostate* **1985**, *6* (3), 293-301.
65. Aragon-Ching, J.; Nader, R.; El Amm, J., Role of chemotherapy in prostate cancer. *Asian J. Androl.* **2018**, *20* (3).
66. Wozniak, A. J.; Blumenstein, B. A.; Crawford, E. D.; Boileau, M.; Rivkin, S. E.; Fletcher, W. S., Cyclophosphamide, methotrexate, and 5-fluorouracil in the treatment of metastatic prostate cancer. A southwest oncology group study. *Cancer* **1993**, *71* (12), 3975-3978.
67. Fan, X.; Wang, L.; Guo, Y.; Xiong, X.; Zhu, L.; Fang, K., Inhibition of prostate cancer growth using doxorubicin assisted by ultrasound-targeted nanobubble destruction. *Int. J. Nanomedicine* **2016**, *Volume 11*, 3585-3596.
68. Berry, W.; Dakhil, S.; Modiano, M.; Gregurich, M.; Asmar, L., Phase III study of mitoxantrone plus low dose prednisone versus low dose prednisone alone in patients with asymptomatic hormone refractory prostate cancer. *J. Urol.* **2002**, *168* (6), 2439-43.
69. Obasaju, C.; Hudes, G. R., Paclitaxel and docetaxel in prostate cancer. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **2001**, *15* (3), 525-45.
70. de Bono, J.; Mateo, J.; Fizazi, K.; Saad, F.; Shore, N.; Sandhu, S.; Chi, K. N.; Sartor, O.; Agarwal, N.; Olmos, D.; Thiery-Vuillemin, A.; Twardowski, P.; Mehra, N.; Goessl, C.; Kang, J.; Burgents, J.; Wu, W.; Kohlmann, A.; Adelman, C. A.; Hussain, M., Olaparib for metastatic castration-resistant prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382* (22), 2091-2102.
71. Abida, W.; Patnaik, A.; Campbell, D.; Shapiro, J.; Bryce, A. H.; McDermott, R.; Sautois, B.; Vogelzang, N. J.; Bambury, R. M.; Voog, E.; Zhang, J.; Piulats, J. M.; Ryan, C. J.; Merseburger, A. S.; Daugaard, G.; Heidenreich, A.; Fizazi, K.; Higano, C. S.; Krieger, L. E.; Sternberg, C. N.; Watkins, S. P.; Despain, D.; Simmons, A. D.; Loehr, A.; Dowson, M.; Golsorkhi, T.; Chowdhury, S.; investigators, T., Rucaparib in men with metastatic castration-resistant prostate cancer harboring a BRCA1 or BRCA2 gene alteration. *J. Clin. Oncol.* **2020**, *38* (32), 3763-3772.
72. Handy, C. E.; Antonarakis, E. S., Sipuleucel-T for the treatment of prostate cancer: novel insights and future directions. *Future Oncol.* **2018**, *14* (10), 907-917.
73. Shim, M.; Bang, W. J.; Oh, C. Y.; Lee, Y. S.; Cho, J. S., Effectiveness of three different luteinizing hormone-releasing hormone agonists in the chemical castration of patients with prostate cancer: goserelin versus triptorelin versus leuprolide. *Investig. Clin. Urol.* **2019**, *60* (4), 244-250.
74. Peer, A.; Gottfried, M.; Sinibaldi, V.; Carducci, M. A.; Eisenberger, M. A.; Sella, A.; Leibowitz-Amit, R.; Berger, R.; Keizman, D., Comparison of abiraterone acetate versus ketoconazole in patients with metastatic castration resistant prostate cancer refractory to docetaxel. *Prostate* **2014**, *74* (4), 433-40.
75. Mitsiades, N.; Kaochar, S., Androgen receptor signaling inhibitors: post-chemotherapy, pre-chemotherapy and now in castration-sensitive prostate cancer. *Endocr. Relat. Cancer* **2021**, *28* (8), T19-T38.
76. Luo, J.; Tian, J.; Chou, F.; Lin, C.; Xing, E. Z.; Zuo, L.; Niu, Y.; Yeh, S.; Chang, C., Targeting the androgen receptor (AR) with AR degradation enhancer ASC-J9(R) led to



- increase docetaxel sensitivity via suppressing the p21 expression. *Cancer Lett.* **2019**, *444*, 35-44.
77. Schwarting, A. E., Dimeric natural compounds with pharmacological activity. In *New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity*, 1977; pp 197-211.
78. Rietman, E. A.; Karp, R. L.; Tuszyński, J. A., Review and application of group theory to molecular systems biology. *Theor. Biol. Medical Model.* **2011**, *8* (1).
79. Peter Atkins, J. d. P., The symmetry elements of objects. In *Physical Chemistry*, 8 ed.; company, W. H. F. a., Ed. Oxford University Press: Great Britains, 2006.
80. Voloshchuk, T.; Farina, N. S.; Wauchope, O. R.; Kiprowska, M.; Haberfield, P.; Greer, A., Molecular bilateral symmetry of natural products: prediction of selectivity of dimeric molecules by density functional theory and semiempirical calculations. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67* (7), 1141-1146.
81. Kim, C.; Basner, J.; Lee, B., Detecting internally symmetric protein structures. *BMC Bioinform.* **2010**, *11* (1).
82. Goodsell, D. S.; Olson, A. J., Structural symmetry and protein function. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2000**, *29* (1), 105-153.
83. Blundell, T. L.; Srinivasan, N., Symmetry, stability, and dynamics of multidomain and multicomponent protein systems. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, *93* (25), 14243-14248.
84. Bryngelson, J. D.; Onuchic, J. N.; Socci, N. D.; Wolynes, P. G., Funnels, pathways, and the energy landscape of protein folding: A synthesis. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **1995**, *21* (3), 167-195.
85. Nadal, M.; Prekovic, S.; Gallastegui, N.; Helsen, C.; Abella, M.; Zielinska, K.; Gay, M.; Vilaseca, M.; Taulès, M.; Houtsmuller, A. B.; van Royen, M. E.; Claessens, F.; Fuentes-Prior, P.; Estébanez-Perpiñá, E., Structure of the homodimeric androgen receptor ligand-binding domain. *Nat. Commun.* **2017**, *8* (1).
86. Berube, G., Natural and synthetic biologically active dimeric molecules: anticancer agents, anti-HIV agents, steroid derivatives and opioid antagonists. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13* (2), 131-154.
87. Tamiz, A. P.; Zhang, J.; Zhang, M.; Wang, C. Z.; Johnson, K. M.; Kozikowski, A. P., Application of the bivalent ligand approach to the design of novel dimeric serotonin reuptake inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (22), 5393-5394.
88. Mammen, M.; Choi, S.-K.; Whitesides, G. M., Polyvalent interactions in biological systems: implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37* (20), 2754-2794.
89. Paquin, A.; Reyes-Moreno, C.; Berube, G., Recent advances in the use of the dimerization strategy as a means to increase the biological potential of natural or synthetic molecules. *Molecules* **2021**, *26* (8).
90. Holzbeierlein, J. M.; Castle, E.; Thrasher, J. B., Complications of androgen deprivation therapy: prevention and treatment. *Oncology (Williston Park)* **2004**, *18* (3), 303-9; discussion 310, 315, 319-21.
91. Sevrioukova, I. F.; Poulos, T. L., Understanding the mechanism of cytochrome P450 3A4: recent advances and remaining problems. *Dalton Trans.* **2013**, *42* (9), 3116-26.



92. Bastien, D.; Leblanc, V.; Asselin, É.; Bérubé, G., First synthesis of separable isomeric testosterone dimers showing differential activities on prostate cancer cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20* (7), 2078-2081.
93. Vesper, A.-R.; Lacroix, J.; C.-Gaudreault, R.; Tajmir-Rihai, H.-A.; Bérubé, G., Synthesis of novel C2-symmetric testosterone dimers and evaluation of antiproliferative activity on androgen-dependent and -independent prostate cancer cell lines. *Steroids* **2016**, *115*, 98-104.
94. Starka, L., Epitestosterone--a hormone or not. *Endocr. Regul.* **1993**, *27* (2), 43-8.
95. Jasuja, R.; Ramaraj, P.; Mac, R. P.; Singh, A. B.; Storer, T. W.; Artaza, J.; Miller, A.; Singh, R.; Taylor, W. E.; Lee, M. L.; Davidson, T.; Sinha-Hikim, I.; Gonzalez-Cadavid, N.; Bhasin, S.,  $\Delta$ -4-androstene-3,17-dione binds androgen receptor, promotes myogenesis in vitro, and increases serum testosterone levels, fat-free mass, and muscle strength in hypogonadal men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2005**, *90* (2), 855-63.
96. Sojo-Aranda, I.; Cortes-Gallegos, V., Ethinylestradiol from contraceptive formulations and the ovarian response: an estrogen dose-dependency on natural estradiol concentrations. *Gynecol. Endocrinol.* **1995**, *9* (1), 63-6.
97. McNicholas, C.; Swor, E.; Wan, L.; Peipert, J. F., Prolonged use of the etonogestrel implant and levonorgestrel intrauterine device: 2 years beyond Food and Drug Administration-approved duration. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2017**, *216* (6), 586 e1-586 e6.
98. G., A., *Cosmetics Applications of Laser and Light-Based Systems*. William Andrew: 2008.
99. Carmichael, J.; DeGraff, W. G.; Gazdar, A. F.; Minna, J. D.; Mitchell, J. B., Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **1987**, *47* (4), 936-42.
100. Ford, C. H.; Richardson, V. J.; Tsaltas, G., Comparison of tetrazolium colorimetric and [3H]-uridine assays for in vitro chemosensitivity testing. *Cancer chemother. pharmacol.* **1989**, *24* (5), 295-301.
101. Dean, J. W.; Christiansen, R. G., The  $\Delta^4$ -ethylene ketals of testosterone and testosterone acetate. *J. Org. Chem.* **2002**, *28* (8), 2110-2115.
102. Sartori, G.; Ballini, R.; Bigi, F.; Bosica, G.; Maggi, R.; Righi, P., Protection (and deprotection) of functional groups in organic synthesis by heterogeneous catalysis. *Chem. Rev.* **2003**, *104* (1), 199-250.
103. Thorp, L.; Kamm, O., A study of the mechanism of the Grignard reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *36* (5), 1022-1028.
104. Bartolo, N. D.; Woerpel, K. A., Mechanistic insight into additions of allylic Grignard reagents to carbonyl compounds. *J. Org. Chem.* **2018**, *83* (17), 10197-10206.
105. Gajewski, J. J.; Bocian, W.; Brichford, N. L.; Henderson, J. L., Secondary deuterium kinetic isotope effects in irreversible additions of allyl reagents to benzaldehyde. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (12), 4236-4240.
106. Gajewski, J. J.; Bocian, W.; Harris, N. J.; Olson, L. P.; Gajewski, J. P., Secondary deuterium kinetic isotope effects in irreversible additions of hydride and carbon nucleophiles to aldehydes: a spectrum of transition states from complete bond formation to single electron transfer. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *121* (2), 326-334.

107. Pinkus, A. G.; Servoss, W. C., Studies on the mechanism of the enolization reaction of Grignard reagents with ketones. *J. Chem. Soc., Perkin Transactions 2* **1979**, (11).
108. Kharasch, M. S.; Weinhouse, S., Grignard reagents—their reducing action and rates of addition\*. *J. Org. Chem.* **2002**, *01* (2), 209-230.
109. Imamoto, T.; Takiyama, N.; Nakamura, K.; Hatajima, T.; Kamiya, Y., Reactions of carbonyl compounds with Grignard reagents in the presence of cerium chloride. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *111* (12), 4392-4398.
110. Lee, J.-s.; Velarde-Ortiz, R.; Guijarro, A.; Joshua R. Wurst, a.; Rieke, R. D., Low-temperature formation of functionalized Grignard reagents from direct oxidative addition of active magnesium to aryl bromides. *J. Org. Chem.* **2000**, *65* (17), 5428-5430.
111. Patra, S. G.; Das, N. K., Recent advancement on the mechanism of olefin metathesis by Grubbs catalysts: a computational perspective. *Polyhedron* **2021**, *200*.
112. Kress, J.; Osborn, J. A., Tungsten carbene complexes in olefin metathesis: a cationic and chiral active species. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *105* (20), 6346-6347.
113. Koh, M. J.; Nguyen, T. T.; Lam, J. K.; Torker, S.; Hyvl, J.; Schrock, R. R.; Hoveyda, A. H., Molybdenum chloride catalysts for Z-selective olefin metathesis reactions. *Nature* **2017**, *542* (7639), 80-85.
114. Tebbe, F. N.; Parshall, G. W.; Ovenall, D. W., Titanium-catalyzed olefin metathesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *101* (17), 5074-5075.
115. Ogba, O. M.; Warner, N. C.; O'Leary, D. J.; Grubbs, R. H., Recent advances in ruthenium-based olefin metathesis. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47* (12), 4510-4544.
116. McGrath, D. V.; Grubbs, R. H., The mechanism of aqueous ruthenium(II)-catalyzed olefin isomerization. *Organometallics* **2002**, *13* (1), 224-235.
117. Ward, D. E.; Rhee, C. K., Chemoselective reductions with sodium borohydride. *Can. J. Chem.* **1989**, *67* (7), 1206-1211.
118. Miklos M. Breuer, E. G. K., Douglas Shander, Vera R. Usdin, Hermes van der Lee Alteration of character of male beard growth. US4885289A, 1985.
119. Panesar, N. S.; Herries, D. G.; Stitch, S. R., Effects of cyproterone and cyproterone acetate on the adrenal gland in the rat: studies in vivo and in vitro. *J. Endocrinol.* **1979**, *80* (2), 229-NP.
120. Denisov, I. G.; Mak, P. J.; Grinkova, Y. V.; Bastien, D.; Bérubé, G.; Sligar, S. G.; Kincaid, J. R., The use of isomeric testosterone dimers to explore allosteric effects in substrate binding to cytochrome P450 CYP3A4. *J. Inorg. Biochem.* **2016**, *158*, 77-85.
121. Wright, W. C.; Chenge, J.; Wang, J.; Girvan, H. M.; Yang, L.; Chai, S. C.; Huber, A. D.; Wu, J.; Oladimeji, P. O.; Munro, A. W.; Chen, T., Clobetasol propionate is a heme-mediated selective inhibitor of human cytochrome P450 3A5. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (3), 1415-1433.
122. Weiss, J. N., The Hill equation revisited: uses and misuses. *FASEB J.* **1997**, *11* (11), 835-41.
123. Conner, K. P.; Woods, C. M.; Atkins, W. M., Interactions of cytochrome P450s with their ligands. *Arch. Biochem. Biophys.* **2011**, *507* (1), 56-65.
124. Niwa, T.; Shiraga, T.; Yamasaki, S.; Ishibashi, K.; Ohno, Y.; Kagayama, A., In vitro activation of 7-benzoyloxyresorufin O-debenzylation and nifedipine oxidation in human liver microsomes. *Xenobiotica* **2010**, *33* (7), 717-729.

125. Leder, B. Z.; Catlin, D. H.; Longcope, C.; Ahrens, B.; Schoenfeld, D. A.; Finkelstein, J. S., Metabolism of orally administered androstenedione in young men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2001**, *86* (8), 3654-3658.
126. W.L.F. Armarego, C. L. L. C., *Purification of Laboratory Chemicals*. sixth ed.; Butterworth-Heinemann: Oxford, 2009.
127. Still, W. C.; Kahn, M.; Mitra, A., Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *J. Org. Chem.* **2002**, *43* (14), 2923-2925.
128. Ouellette, V.; Côté, M.-F.; Gaudreault, R. C.; Tajmir-Riahi, H.-A.; Bérubé, G., Second-generation testosterone-platinum(II) hybrids for site-specific treatment of androgen receptor positive prostate cancer: design, synthesis and antiproliferative activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *179*, 660-666.